



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

“VIGILANCIA MOLECULAR DE LOS
PARÁSITOS DE LA MALARIA EN
COMUNIDADES REMOTAS DE LA
AMAZONÍA PERUANA”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

LUIS ESTEBAN CABRERA SOSA

LIMA – PERÚ

2024

ASESORA

Dra. Dionicia Gamboa Vilela

CO ASESOR

Dr. Christopher Delgado Ratto

JURADO DE TESIS

DR. JORGE ENRIQUE RODRÍGUEZ BAILÓN

PRESIDENTE

DRA. VANESSA KARINA ADAUI SICHERI

VOCAL

DRA. CLAUDIA INÉS GLORIA MACHICADO RIVERO

SECRETARIA

DEDICATORIA

A mis padres: mamá Carmen y papá Tito

“Science is a horizon to search for,
not a prize to hold in your hand.”

Waddles, *Gravity Falls*

“We will breathe in. Breathe through.
Breathe deep. Breathe out.
And I am a doctor now,
so I know how breathing works.”

Taylor Swift, *Commencement speech*
New York University's class of 2022

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no ha podido ser posible sin la ayuda de muchas personas.

En primer lugar, a la Dra. Dionicia Gamboa, quien no solo me confió en mí como tesista, sino también como investigador y persona. Siempre voy a estar agradecido por haberme integrado a la familia del grupo Malaria, por su gran disposición para que cumpla con mis objetivos y por ayudarme a mantener la calma cuando lo necesitaba, en especial cuando pensaba que no había solución fácil o presupuesto.

En segundo lugar, al Dr. Christopher Delgado. En estos años, creo que ambos nos llevamos varios aprendizajes uno del otro, en lo científico como en lo personal. Gracias por darme la primera oportunidad de atreverme a enfrentar al mundo con el curso EBQ en la University of Antwerp. Gracias por ofrecerme la mano y escucharme en los momentos que he requerido cuando andaba por Bélgica. Gracias por confiar en mí y haberme sabido leer a veces sin siquiera pedirlo.

También quiero agradecer a la Dra. Anna Rosanas y la Dra. Eline Kattenberg del Institute of Tropical Medicine at Antwerp. Anna, gracias por recibirme en la Malariology Unit y hacerme sentir como en casa. Gracias por su buena disposición a colaborar con nosotros y por tu buen ánimo que nos saca una sonrisa siempre. Eline, gracias por todo. Tú no eres mi co-asesora por formalidades de tiempo, pero quiero que sepas que para mí lo eres de corazón. Te admiro y considero una mentora y un modelo a seguir. Gracias por brindarme ayuda siempre en todo sentido. También quiero aprovechar en mencionar a todos los miembros de la Unidad que siempre están dispuestos a darme la mano y hacerme

sentir bienvenido: Mathijs, Pieter Guetens, Pieter Monsieurs, Katjin, Erin, Pieter Moris, Vera, Dalia, Yasmina, Ramses.

Gracias a todos los miembros de los Laboratorio de Malaria 308, 309 y 401 del LID. Berónica, gracias por hacerme sentir como en familia desde el día uno que llegué al laboratorio y por ser un apoyo constante durante este tiempo. Roberson y Erick, gracias no solo por ayudarme en los experimentos y análisis de resultados, sino también por el tiempo compartido. Con nuestras pequeñas discusiones, fundamos el grupo de EpiMol en el laboratorio. Pamela y Yovana, gracias por los buenos ánimos y siempre estar dispuestas a ayudarme y resolver dudas. Gracias a CoreB (Caroline, Carmen, Joaquín y Carlos), siempre han estado ávidos de darnos una mano incluso para cuestiones pequeñas. Rosa, Yulissa y Jeancarlo, gracias por ayudarnos en lo administrativo y disculpas por algunos dolores de cabeza en el camino. Gracias también a todos los demás miembros, tesisistas y rotantes.

No quiero dejar de lado a todas las personas que han ayudado a la colección de muestras y al trabajo de campo en los distintos proyectos. Primero, a todos los habitantes de cada una de las comunidades estudiadas, en particular a las de Nueva Jerusalén (NJ). Gracias por confiar en el equipo y proporcionarnos las muestras. A los miembros del laboratorio satélite de Iquitos por ser intermediario y su soporte. A Óscar Nolasco y Carlos Fernández, que sin ellos, no habiéramos llegado a coleccionar las muestras en NJ. A la GERESA-Loreto por ayudarnos en la colección de muestras y el control de calidad. A Hugo Valvidia y a Keare Barazorda del NAMRU-South por presentarnos ayuda en parte del diagnóstico molecular y por siempre estar dispuestos en colaborar.

Tampoco quiero olvidarme de mi familia; en especial a mis padres, por apoyarme en esto de la ciencia a pesar de que no lo entienden mucho. Estos años hemos aprendido a lidiar con la distancia también, así que gracias por el soporte. Con ellos estaré eternamente agradecido.

También, quiero agradecer a mis amigos. En primer lugar, a Viviana Sánchez-Aizcorbe, José Alberto Nakamoto, Juan Blume y Flame Darinov. Gracias por estar ahí cuando los necesité en los momentos más duros y por tener las palabras indicadas en los momentos precisos. A María Pinedo, Brayan Gonzáles y Andrés Posadas, por asegurarse de hacerme sentir acompañado y en casa durante mis estadias en Bélgica. A mis compañeros del doctorado por siempre estar ahí para desahogarnos y apoyarnos. Y finalmente, a todos los que durante estos 3 años han pasado por mi vida, por corto o largo tiempo, tanto en Bélgica como en Perú, en especial aquellos que me dejaron algunas enseñanzas.

El “Luis” del 2021 no es el mismo que el del 2024. Por ello, una vez más, muchas gracias a todos y todas.

Luis Cabrera

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

Los estudios de doctorado, la pasantía en el Institute of Tropical Medicine Antwerp (ITM-A) en 2022 y la genotipificación por microsátélites fueron financiados por el Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) a través su unidad ejecutora Programa Nacional de Investigación Científica y Estudios Avanzados (PROCIENCIA) en el marco del proyecto N° 165-2020-FONDECYT-Programa de Doctorado en Ciencias mención Bioquímica y Biología molecular-UPCH.

La colección de muestras en NJ, Yavarí y Andoas, el curso EBQ en la University of Antwerp en 2021, y la secuenciación por los ensayos AmpliSeq y la genotipificación por microsátélites fueron financiados por el proyecto VLIR-USO TEAM “Joint efforts for the Elimination of Malaria in the Peruvian Amazon” del VLIR-UOS (PE2018TEA470A102).

La secuenciación con los ensayos AmpliSeq y el análisis de resultados, así como mi pasantía en el ITM-A en 2023 fueron financiados por el Proyecto de Cooperación Belga para el Desarrollo (DGD) a través de los proyectos de colaboración Acuerdo Marco 4 (FA4 Peru 2017-2021) y 5 (FA5 Peru 2022-2026) entre el Instituto de Medicina Tropical “Alexander von Humboldt” y el IMT-A.

La colección y procesamiento de muestras en Mazán y Santa Emilia fueron financiados por el proyecto “AMAZONIA-International Center of Excellence for Malaria Research” (5U19AI089681, NIH-USA).

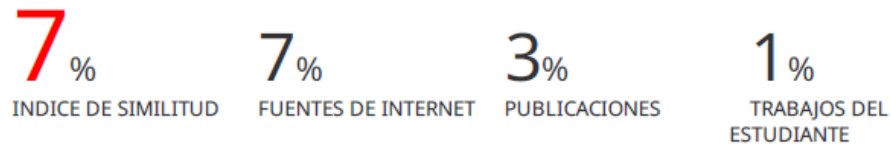
Parte del diagnóstico molecular de las muestras de NJ fue financiada por la Armed Forces Health Surveillance Division (AFHSD) y su brazo Global

Emerging Infections Surveillance and Response (GEIS) Branch, bajo el proyecto

P0134_23_N6.

VIGILANCIA MOLECULAR DE LOS PARÁSITOS DE LA MALARIA EN COMUNIDADES REMOTAS DE LA AMAZONÍA PERUANA

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	assets.researchsquare.com Fuente de Internet	1%
2	www.researchsquare.com Fuente de Internet	1%
3	etda.libraries.psu.edu Fuente de Internet	<1%
4	Submitted to uncedu Trabajo del estudiante	<1%
5	alicia.concytec.gob.pe Fuente de Internet	<1%
6	www.scielo.org.co Fuente de Internet	<1%
7	fdocument.org Fuente de Internet	<1%
8	diposit.ub.edu Fuente de Internet	<1%
9	ciencias.cayetano.edu.pe Fuente de Internet	<1%

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
III.	MARCO TEÓRICO	7
3.1	Generalidades y Epidemiología	7
3.2	Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i>	8
3.3	Características biológicas de <i>P. vivax</i> y <i>P. falciparum</i>	10
3.4	Diagnóstico de malaria	11
3.5	Características de las infecciones de malaria en Perú	15
3.6	Tratamiento y Resistencia a antimaláricos	17
3.7	Genética de Poblaciones en <i>Plasmodium</i>	24
3.8	Vigilancia y programas de control en malaria	31
IV.	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	36
V.	OBJETIVOS	39
5.1	Pregunta de investigación	39
5.2	Objetivo general	39
5.3	Objetivos específicos	39
VI.	METODOLOGÍA	40
6.1	Sitios de estudio y Colección de muestra	40
6.2	Aspectos Éticos	43
6.3	Muestras de estudio	44
6.4	Procesamiento de muestras	47
6.5	Ensayos AmpliSeq	48
6.6	Criterios de inclusión para el análisis	51
6.7	Análisis de datos	52
6.8	Marcadores de resistencia	54
6.9	Genotipificación de los genes <i>pfhrp2/3</i>	55
6.10	Genotipificación por microsatélites	55
6.11	Análisis de genética de poblaciones con MS y comparación con SNP	58

6.12	Análisis estadísticos	59
VII.	RESULTADOS	61
7.1	Epidemiología de malaria en Nueva Jerusalén (NJ)	61
7.2	Efecto de la intervención ACD en NJ	63
7.3	Microepidemiología de <i>P. vivax</i> (Pv) en NJ	65
7.4	Microepidemiología de <i>P. falciparum</i> (Pf) en NJ	68
7.5	Comparación entre NJ y otras áreas remotas	71
7.6	Marcadores moleculares de resistencia	76
7.7	Genotipificación de <i>pfhrp2/3</i>	78
7.8	Clústeres de <i>P. falciparum</i> en NJ	82
7.9	Genotipificación por microsatélites (MS) y comparación con el ensayo AmpliSeq	85
VIII.	DISCUSIÓN	92
8.1	Epidemiología de la malaria en NJ	92
8.2	Transmisión de <i>P. vivax</i> en NJ	93
8.3	Transmisión de <i>P. falciparum</i> en NJ	94
8.4	Estrategias para controlar la malaria en NJ	95
8.5	Dinámica de transmisión de malaria en otras áreas remotas	97
8.6	Marcadores moleculares de resistencia a antimaláricos	98
8.7	Genotipificación de HRP2/3	100
8.8	Comparación del ensayo AmpliSeq con otros métodos de genotipificación	100
8.9	Relevancia	103
8.10	Limitaciones	105
IX.	CONCLUSIONES	108
X.	RECOMENDACIONES	110
XI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
XII.	ANEXOS	

Lista de Figuras

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> .	9
Figura 2. Sitios de estudio.	43
Figura 3. Distribución diaria de infecciones por <i>P. vivax</i> y <i>P. falciparum</i> durante el PCD en NJ.	63
Figura 4. Efecto de la intervención de ACD sobre la malaria en NJ.	65
Figura 5. Estructura poblacional y conectividad parasitaria de Pv en NJ	68
Figura 6. Estructura poblacional y conectividad parasitaria de Pf en NJ	71
Figura 7. Genética de poblaciones y conectividad de muestras de Pv de NJ y otras áreas remotas.	74
Figura 8. Genética de poblaciones y conectividad de muestras de Pf de NJ y otras áreas remotas.	76
Figura 9. Genotipificación de los genes <i>pfhrp2</i> y <i>pfhrp3</i> .	82
Figura 10. Características de los clústeres de <i>P. falciparum</i> en NJ.	85
Figura 11. Comparación de la resolución genética entre el <i>barcode</i> de SNPs del ensayo AmpliSeq y microsatélites (MS) para <i>P. vivax</i> .	88
Figura 12. Comparación de la resolución genética entre el <i>barcode</i> de SNPs del ensayo AmpliSeq y microsatélites (MS) para <i>P. falciparum</i> .	91

Lista de Tablas

Tabla 1. Estudios sobre la delección de los genes <i>pfhrp2</i> y <i>pfhrp3</i> en la Amazonía peruana	13
Tabla 2. Genes asociados con resistencia a antimaláricos en <i>P. falciparum</i>	19
Tabla 3. Estudios de vigilancia de marcadores moleculares de resistencia en Perú.	22
Tabla 4. Estudios de genética de poblaciones de <i>Plasmodium vivax</i> y <i>P. falciparum</i> en la Amazonía peruana	29
Tabla 5. Estrategias recomendadas de acuerdo con el nivel de endemicidad	32
Tabla 6. Número de muestras utilizadas en los ensayos AmpliSeq por especie y localidad	46
Tabla 7. Características sociodemográficas e infecciones de malaria durante la detección activa (ACD) y pasiva (PCD) de casos en Nueva Jerusalén	62
Tabla 8. Proporción de presencia o delección de los genes <i>pfhrp2/3</i> por PCR y el ensayo AmpliSeq.	80

Lista de Anexos

Tabla S1. Proporción de infecciones policlonales.

Tabla S2. Lista de SNPs críticos en muestras de *P. vivax*

Tabla S3. Lista de SNPs críticos en muestras de *P. falciparum*

Tabla S4. Frecuencias de mutaciones y haplotipos en marcadores moleculares asociados a resistencia en muestras de *P. falciparum* por lugar y año.

Tabla S5. Frecuencias de mutaciones y haplotipos en marcadores moleculares asociados a resistencia en muestras de *P. falciparum* en Nueva Jerusalén

Tabla S6. Frecuencias de mutaciones y haplotipos en marcadores moleculares potencialmente asociados a resistencia en muestras de *P. vivax* por lugar y año.

Tabla S7. Comparación de los resultados por PCR y el ensayo AmpliSeq para la genotipificación de *pfhrp2/3*.

Figura S1. Clusterización, diversidad y diferenciación genética de las muestras de Pv en NJ.

Figura S2. Clusterización, diversidad y diferenciación genética de las muestras de Pf en NJ.

Figura S3. Estructura poblacional y red de IBD de las muestras de Pf en NJ (por meses) y otras áreas remotas.

Figura S4. Diversidad y diferenciación genética de los clústeres temporales de Pf en NJ.

Figura S5. Porcentaje de data faltante en la genotipificación por microsatélites (MS).

Figura S6. Inclusión de muestras policlonales y sus haplotipos secundarios.

Figura S7. Estructura poblacional de *P. falciparum* en NJ usando microsatélites (MS) y el *barcode* de SNPs del ensayo AmpliSeq.

Lista de Abreviaturas

ACD	detección activa de casos
ACT	artemisina
ADN	ácido desoxirribonucleico
Apr-May	abril-mayo
CDC	Centro de Control de Enfermedades
CNV	variación en el número de copias
COVID-19	enfermedad por coronavirus de 2019
CQ	cloroquina
DAPC	análisis discriminante de componentes principales
Dec	diciembre
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
Feb	febrero
Fst	índice de fijación
F _{ws}	heterocigosidad intra-muestra
G6PD	6-fosfato deshidrogenasa
h	horas
Hd	diversidad haplotípica
He	heterocigosidad esperada
HRP2	proteína rica en histidina tipo 2
HRP3	proteína rica en histidina tipo 3
IBD	identidad por descendencia
INS	Instituto Nacional de Salud
IPA	Índice parasitario anual
kb/cM	kilobase por centimorgan
km	kilómetros
LAMP	amplificación mediada por lazos
LM	microscopía óptica
Mar	marzo
Me	mediana
MINSA	Ministerio de Salud
MQ	mefloquina
MS	microsatélites
NaOH	hidróxido de sodio
NJ	Nueva Jerusalén
nM	nanomolar
Nov	noviembre
OMS	Organización Mundial de la Salud

PAMAFRO	Proyecto “Control de la Malaria en las Zonas Fronterizas de la Región Andina: Un Enfoque Comunitario”
par/ul	parásitos por microlitro
PCA	análisis de componentes principales
PCD	detección pasiva de casos
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDR	pruebas de diagnóstico rápido
Pf	<i>Plasmodium falciparum</i>
pM	picomolar
PMC	Plan Malaria Cero
PQ	primaquina
Pv	<i>Plasmodium vivax</i>
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RIQ	rango intercuartílico
RPA	amplificación con recombinasa y polimerasa
SNP	polimorfismo de nucleótido único
SP	sulfadoxina y pirimetamina
TFQ	tafenoquina
U	unidad de enzima
wt	tipo silvestre o <i>wild-type</i>
μL	microlitro
π	diversidad nucleotídica

RESUMEN

Las comunidades remotas representan el último paso para eliminar malaria en Perú, pero la información sobre la transmisión es escasa. En este trabajo, se investigó la dinámica de transmisión y marcadores de resistencia en *Plasmodium vivax* (Pv) y *P. falciparum* (Pf) y deleciones en los genes *pfhrp2/3* en Nueva Jerusalén (NJ), una comunidad indígena de Loreto. Para ello, se analizaron muestras de NJ (2019 – 2020, Pv = 68, Pf = 58) mediante los ensayos AmpliSeq. Además, se compararon NJ con otras áreas remotas, y el desempeño del ensayo AmpliSeq con otros métodos como microsatélites y PCR.

La población de Pv de NJ mostró una diversidad moderada ($He = 0.27$) sin diferencias en el tiempo, mientras que la población de Pf mostró una baja diversidad ($He = 0.08$) y formaron clústeres temporales, uno relacionado con un brote en febrero de 2020. Además, los parásitos Pv de NJ estaban poco y altamente diferenciados de las muestras de Mazán y Yavari, respectivamente ($Fst = 0.07 - 0.52$). En cambio, Pf en NJ mostró una diferenciación moderada y cierta conectividad con los parásitos de Andoas, Santa Emilia y Mazán ($Fst = 0.11 - 0.58$).

Los parásitos Pf tuvieron mutaciones de resistencia a cloroquina (57%) y sulfadoxina-pirimetamina (35 – 67%), pero ninguna a artemisinina. Además, los genes *pfhrp2/3* estaban presentes (50 – 68%) en la mayoría de áreas.

Por otro lado, el ensayo AmpliSeq tuvo una mejor resolución que los microsatélites para Pf y similar para Pv, pero no fue concordante con la PCR para la genotipificación de *pfhrp2/3*.

Nuestro estudio muestra una dinámica de transmisión heterogénea y particular de la malaria en NJ y otras áreas alejadas, lo que lleva a proponer estrategias específicas. Los ensayos AmpliSeq representan una herramienta válida para la vigilancia molecular y podría servir para brindar evidencia que contribuya a la toma de decisiones hacia la eliminación de la malaria en Perú.

PALABRAS CLAVES: POBLACIÓN INDÍGENA, ENSAYO AMPLISEQ, DINÁMICA DE TRANSMISIÓN, RESISTENCIA ANTIMALÁRICOS, DELECCIÓN *PFHRP2/3*.

ABSTRACT

Hard-to-reach communities represent the last challenge for malaria elimination in Peru, but information about transmission is scarce. In this study, we investigated the *Plasmodium vivax* (Pv) and *P. falciparum* (Pf) populations in Nueva Jerusalén (NJ), an indigenous community in the Peruvian Amazon, regarding transmission dynamics, resistance markers, and Pf *hrp2/3* deletions. We analyzed NJ samples (2019 – 2020, Pv = 68, Pf = 58) using the AmpliSeq assays. Additionally, we compared NJ isolates to other remote areas, and the assay performance to other methods such as microsatellites and PCR.

NJ's Pv population had modest genetic diversity ($He = 0.27$) with no differences during the study time, while Pf population displayed low diversity ($He = 0.08$) and formed temporal clusters, one linked to an outbreak in February 2020. Additionally, NJ's Pv parasites were little and highly differentiated from Mazan and Yavari isolates, respectively ($F_{st} = 0.07 - 0.52$). In contrast, Pf in NJ showed modest differentiation and some connectivity with Andoas, Santa Emilia and Mazan parasites ($F_{st} = 0.11 - 0.58$).

Pf parasites carried resistance mutations to chloroquine (57%) and sulfadoxine-pyrimethamine (35 – 67%), but none to artemisinin. Moreover, *pfhrp2/3* genes were present (50 – 68%) in most places.

On the other hand, the AmpliSeq assay had better genetic resolution than microsatellites for Pf and similar for Pv but was not concordant with PCR for *pfhrp2/3* genotyping.

Our study shows a heterogeneous and specific transmission dynamics of malaria in NJ and other remote areas, leading to proposing specific strategies. The AmpliSeq assays represent a valid tool for molecular surveillance and could contribute to malaria elimination in Peru.

KEYWORDS: INDIGENOUS POPULATION, AMPLISEQ ASSAY, TRANSMISSION DYNAMICS, ANTIMALARIAL DRUG RESISTANCE, *PFHRP2/3* DELETION.

I. INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad infecciosa endémica en el Perú, principalmente en la selva amazónica, siendo Loreto la región con el mayor número de casos. *Plasmodium vivax* es la especie predominante en esa zona, seguida de *P. falciparum* (MINSA, 2022a). El nuevo “Plan hacia la eliminación de la malaria (Primera Etapa: 2022 – 2030)” tiene como objetivo disminuir los casos de malaria hasta en 90% en Perú para el 2030 (MINSA, 2022b).

Las comunidades remotas, aquellas con difícil acceso al sistema de salud, representan la última barrera para la eliminación de la malaria, debido a su lejanía geográfica y las diferencias socioculturales (Robortella *et al.*, 2020; Meireles *et al.*, 2020). En el Perú, las comunidades indígenas continúan siendo las más afectadas por la malaria en la Amazonía. (Sanchez *et al.*, 2015). Así, los distritos con población nativa contribuyeron en el 75% del número total de casos en el 2020 (MINSA, 2022b). De esta forma, la investigación en malaria debe ser focalizada en estas áreas para lograr combatir adecuadamente la enfermedad.

La vigilancia molecular es el uso de la biología molecular para obtener datos epidemiológicos que puedan emplearse para monitorear, evaluar y afinar las estrategias en los programas nacionales contra enfermedades infecciosas (Guirou *et al.*, 2020). Para malaria, existen diversos usos de la vigilancia molecular: buscar marcadores moleculares de resistencia, determinar los cambios de transmisión y la conectividad parasitaria o flujo genético, identificar casos importados, evaluar delecciones en los

genes *pfhrp2/3* – asociado a fallas en pruebas de diagnóstico rápido en *P. falciparum*, entre otros (Dalmat *et al.*, 2019).

Sin embargo, la mayoría de estudios de vigilancia molecular de malaria en Perú se concentran en zonas periurbanas o rurales con fácil acceso (Delgado-Ratto *et al.*, 2016). Teniendo en cuenta que existe una heterogeneidad del nivel de transmisión en el país, las estrategias actuales pueden no ser las adecuadas en las comunidades alejadas. La falta de información en este tipo de zonas dificulta la elaboración de estrategias específicas. Por tanto, son necesarios estudios de vigilancia en comunidades remotas y de difícil acceso (Fernández-Miño *et al.*, 2021).

En ese sentido, esta tesis propone realizar un estudio de vigilancia molecular de *P. vivax* y *P. falciparum* en comunidades nativas y remotas de la Amazonía Peruana, con énfasis en la comunidad de Nueva Jerusalén (NJ). Se caracterizó la dinámica de transmisión, los marcadores moleculares de resistencia y las deleciones en los genes *pfhrp2/3* utilizando los novedosos ensayos de secuenciación de nueva generación AmpliSeq. Además de comparar NJ con otras áreas remotas. Se espera que esta información ayude a entender el estado de la malaria en NJ y sirva para proponer políticas de intervención específicas.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el Perú, los casos de malaria han variado después de la implementación de los planes de control/eliminación desplegados por el Ministerio de Salud (MINSA). Desde el 2017, el MINSA implementó el “Plan Malaria Cero”, focalizado en Loreto, la región con mayor proporción de casos (MINSA, 2017). Este plan tuvo como objetivo desarrollar un programa de control de la malaria con enfoque comunitario e intercultural. Para ello, se planteaban como estrategias asegurar el diagnóstico y tratamiento, implementar intervenciones preventivas y promover estilos de vida saludable (MINSA, 2017). Desde el 2017 hasta el 2019, los casos disminuyeron de 54.5 mil a 24.1 mil (MINSA, 2019); lo que se reflejó en una reducción del 70% de casos en Loreto (MINSA, 2022c). Entre el 2020 – 2021, se reportaron menos casos que años anteriores, aunque esto pudo deberse a un sub-registro debido a la pandemia del COVID-19 (Torres *et al.*, 2021). Durante el 2022, el número de casos aumentó hasta más de 26 mil (MINSA, 2022a). En ese año, el MINSA lanzó el “Plan hacia la eliminación de la malaria”. Este nuevo plan se enfoca en Loreto y otras regiones con reporte de casos en los últimos años con la finalidad de disminuir los casos de malaria hasta en 90% al 2030. El plan consta de 3 fases, cada uno con enfoques y estrategias distintos, en donde destaca que en las fases más avanzadas urge el uso de herramientas moleculares para diagnóstico y vigilancia. (MINSA, 2022b). Así, durante el año 2023, se reportaron más de 22 mil casos; que es menor a lo reportado en el mismo periodo durante el 2022 (MINSA, 2023).

Uno de los problemas identificados por el nuevo plan de eliminación es que las poblaciones indígenas de la Amazonía peruana son las más afectadas por la malaria (MINSA, 2022b). Usualmente, dichas comunidades son consideradas el último desafío para la eliminación de la malaria, puesto que la implementación de estrategias por parte de las autoridades no llega a ser efectiva por su difícil acceso y las diferencias culturales (Meireles *et al.*, 2020). En Perú, los 10 distritos con mayor número de casos fueron aquellos con población nativa, concentrando el 75% de los casos totales reportados en el 2020. Además, la reducción del índice parasitario anual (IPA) en dichos distritos entre 2017 y 2020 fue menor que la disminución del IPA a nivel nacional (MINSA, 2022b). Debido a todo ello, las estrategias deben estar enfocadas en dichas áreas.

El fortalecimiento del sistema de vigilancia para el monitoreo de casos de malaria es uno de los objetivos del nuevo plan (MINSA, 2022b). En Perú, la vigilancia epidemiológica a nivel público se ha concentrado en los casos reportados por microscopía en distintos centros de salud (MINSA, 2022a). A nivel de investigación, además de complementar lo anterior con diagnóstico molecular, se han realizado diversos estudios de vigilancia molecular con distintas finalidades: investigar dinámicas de transmisión (Delgado-Ratto *et al.*, 2016; Manrique *et al.*, 2019), detectar marcadores moleculares de resistencia (Villena *et al.*, 2022; Kattenberg *et al.*, 2023), describir brotes de casos (Okoth *et al.*, 2016, Baldeviano *et al.*, 2015), evaluar deleciones en los genes *pfhrp2/3* asociadas a fallas en pruebas de diagnóstico rápido (Bendezu *et al.*, 2022; Valdivia *et al.*, 2022), entre otros.

No obstante, la información proveniente de vigilancia molecular de malaria en zonas remotas e indígenas es escasa. Gran parte de los estudios se concentran en comunidades urbanas o peri-urbanas cercanas a Iquitos, la capital de Loreto, o en comunidades rurales con fácil acceso como carreteras o ríos (Delgado-Ratto *et al.*, 2016). Dentro de las comunidades remotas en Loreto, el distrito de Mazán (50km desde Iquitos) y la comunidad de Santa Emilia (120km desde Iquitos) han sido estudiadas (Manrique, 2018; Manrique *et al.*, 2019). Si bien estas áreas tienen población indígena, la mayor proporción se identifica como mestiza. De esta manera, pocos estudios de malaria en comunidades enteramente nativas se han realizado en el país. En Amazonas, la segunda región con mayor número de casos durante el 2023, se ha reportado un brote de *P. falciparum* en comunidades indígenas de Condorcanqui en el 2019 (Montenegro *et al.*, 2021) que no tuvo evidencia de resistencia a artemisinina (Sandoval-Bances *et al.*, 2023), así como un estudio mixto que evaluó el impacto de la pandemia del COVID-19 en dicha zona (Paredes, 2022). No hay trabajos sobre vigilancia de malaria en poblaciones nativas de Loreto hasta el momento.

De esta forma, este trabajo propone responder a la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuáles son las características genéticas de las poblaciones de *Plasmodium vivax* y *P. falciparum* en la comunidad de Nueva Jerusalén (NJ) y otras zonas remotas de la Amazonía peruana? Para ello, se realizó un estudio de vigilancia molecular en Nueva Jerusalén, una comunidad indígena Achuar de la Amazonía peruana. Este trabajo se realizó en el marco de las intervenciones del Plan Malaria Cero en dicha comunidad. Se desea conocer cuáles son las características genéticas de las poblaciones de

Plasmodium en la comunidad y compararlo con otras áreas remotas/indígenas de Loreto. En particular, se desea entender cómo es la dinámica de transmisión de *P. vivax* y *P. falciparum*, qué marcadores moleculares de resistencia de *P. falciparum* y *P. vivax* están presentes y cuál es la frecuencia de las deleciones en los genes *pfhrp2/3* de *P. falciparum*. Ello se consiguió haciendo uso de plataformas de secuenciación de nueva generación (ensayos AmpliSeq) y técnicas de genotipificación clásica.

III. MARCO TEÓRICO

3.1 Generalidades y Epidemiología

La malaria es una enfermedad infecciosa que, en humanos, puede ser causada por 5 especies del género *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi* (Sato, 2021). De estas, *P. falciparum* y *P. vivax* son las más estudiadas debido a su mayor distribución en el mundo. La mayoría de las muertes por malaria son causadas por *P. falciparum*, además que más de 90% de las infecciones por esta especie está concentrado en África. Por su parte, *P. vivax* está ampliamente distribuida, siendo la principal especie en América. Se calcula que aproximadamente, el 35% de la población mundial está en riesgo de infección por malaria (Howes *et al.*, 2016).

En 2022, se estima que hubo 249 millones de casos y 608 mil muertes por malaria a nivel mundial, lo que representó un aumento de 5 millones de casos respecto al 2021. Los casos causados por *P. vivax* y *P. falciparum* representaron el 2.8% y 97.1%, respectivamente. *P. falciparum* representó el 99.5% (233 millones) de casos en África. En tanto, *P. vivax* representó el 36.3% de casos fuera de África, siendo el más predominante en América: 72% de los casos en el continente (WHO, 2023).

En Perú, la malaria es endémica, y está presente en la selva amazónica y la costa norte. A nivel de Sudamérica, Perú fue cuarto en el ranking de países según el número de casos registrados en 2022 (WHO, 2023). Durante el 2022, se ha reportado 26368 casos y 6 muertes. El 83.8% de los casos estuvieron concentrados en la región Loreto. *P. vivax* fue la especie que más se reportó en el país (84.4% de los casos), seguido de *P.*

falciparum (15.5%). Además, 31 casos de malaria por *P. malariae* fueron reportados ese año (MINSA, 2022a).

Las características de la transmisión de la malaria dependen de la región: la costa norte, el norte y el sur de la Amazonía. Si bien en todas las regiones, la malaria es estacional (normalmente de diciembre a abril), las principales diferencias radican en la proporción de los parásitos (el norte de la Amazonía es la que tenía mayor proporción de *P. falciparum*) y factores socioeconómicos (proporción de comunidades rurales, accesibilidad a centros de salud, edificación de los hogares, etc.) (Rosas-Aguirre *et al.*, 2016).

3.2 Ciclo de vida de *Plasmodium*

En su ciclo biológico, *Plasmodium* spp utiliza dos huéspedes: el humano y el mosquito *Nyssorhyncus/Anopheles* como intermediario y definitivo, respectivamente (Lima-Junior *et al.*, 2016; Fig. 1). El ciclo comienza con el humano siendo picado por un mosquito hembra infectada del género *Anopheles/Nyssorhyncus*, que inocula esporozoítos que migran al hígado por circulación sanguínea. En este órgano, se forman merozoítos mediante la multiplicación asexual exoeritrocitaria. En el caso de *P. vivax* y *P. ovale*, algunos esporozoítos se transforman en hipnozoítos, estadios durmientes que pueden reactivarse luego de varias semanas, meses o años y generar reinfecciones.

Una vez que los hepatocitos infectados revientan, los merozoítos son liberados e invaden a los eritrocitos, comenzando el ciclo eritrocitario. En esta etapa, los merozoítos maduran pasando por tres estadios: trofozoito joven, trofozoito adulto y

esquizonte. Al romperse, libera nuevamente merozoitos que invaden muchos más eritrocitos iniciando nuevamente esta fase (Mueller *et al.* 2009).

Luego, un grupo de merozoitos formarán los gametocitos, formas sexuales del parásito. El desarrollo de los gametocitos masculinos (microgametocitos) y femeninos (macrogametocitos) ocurre entre 10 y 12 días (Bousema y Drakeley, 2011). Un nuevo mosquito se alimenta de sangre humana infectada e ingiere dichos gametocitos. En el vector, se origina el cigoto al fusionarse los gametos, el cual se va hacia el epitelio intestinal. Ahí se forman sucesivamente el ooquineto y el ooquiste, generando esporozoitos. Luego, los esporozoitos migran a las glándulas salivales y al picar a una nueva persona, da lugar a un nuevo ciclo de infección (Zuck *et al.* 2017).

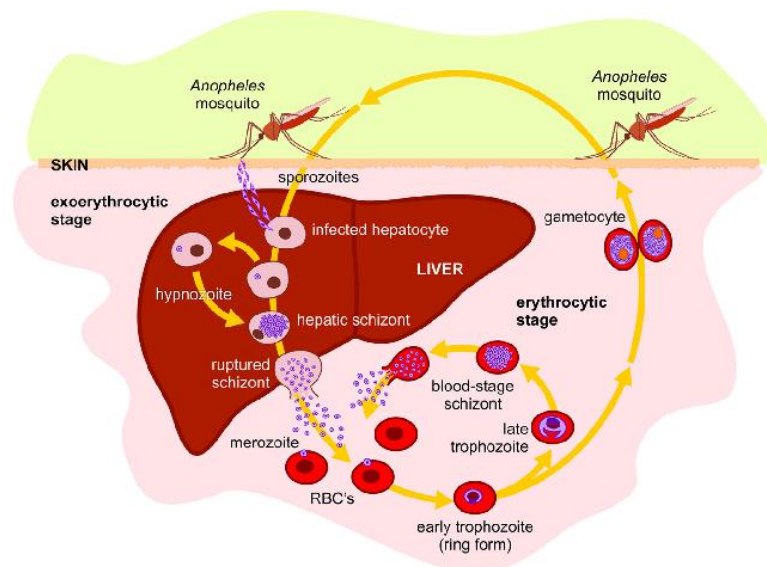


Figura 1. Ciclo de vida de *Plasmodium*. Los parásitos de *Plasmodium* pasan por dos huéspedes: el humano y el mosquito *Anopheles/Nyssorhyncus*. En el humano, tiene dos

etapas: exoeritrocítica en el hígado y eritocítica en la sangre (Tomado de Lima-Junior *et al.*, 2016)

3.3 Características biológicas de *P. vivax* y *P. falciparum*

Existen diferencias en las características biológicas de *P. falciparum* y *P. vivax*. En primer lugar, la formación de esporozoitos de *P. vivax* en los mosquitos ocurre más rápido y a menor temperatura respecto a *P. falciparum*. Esto ocasiona que *P. vivax* esté más distribuido geográficamente y pueda transmitirse en más estaciones. En segundo lugar, algunos vectores de *P. vivax* se alimentan y reposan en exteriores. Por ello, estrategias como los mosquiteros tratados con insecticidas y las fumigaciones en interiores no funcionan tan bien como en *P. falciparum* (Prussing *et al.*, 2018).

Otra característica que diferencia las especies es que *P. vivax* prefiere invadir los reticulocitos (eritrocitos “jóvenes”), que representan el 1-2% de las células sanguíneas (Thomson-Luque y Bautista, 2021). Esto provoca que haya una baja parasitemia en las infecciones y, por tanto, que sea difícil su detección por microscopía. Adicionalmente, los gametocitos de *P. vivax* se producen incluso antes de la aparición de síntomas y son viables (3 – 4 días) menos tiempo que los de *P. falciparum* (10 – 14 días). Estas características provocan que *P. vivax* se pueda transmitir a los mosquitos tempranamente en el curso de la enfermedad, incluso antes de la aparición de síntomas (De Jong *et al.*, 2020).

Finalmente, una de las principales diferencias entre *P. vivax* y *P. falciparum* es la formación de hipnozoitos en la primera especie. Aún se desconocen los factores que

ocasionan su reactivación, que puede darse luego de días o incluso años. Cuando ello ocurre, el episodio que produce se denomina relapso (Chu y White, 2016). Este estadio es un desafío para las estrategias de control, puesto que favorece la transmisión por desplazamiento geográfico de pacientes asintomáticos a zonas donde el vector está presente (Arnott *et al.*, 2012).

3.4 Diagnóstico de malaria

Respecto al diagnóstico, el método de rutina y el más usado es el examen microscópico de frotis sanguíneo teñido con Giemsa, el cual es la “prueba de oro” (*gold estándar*) para el diagnóstico. Se usa la gota gruesa para cuantificar la parasitemia, mientras que el frotis o extendido para la identificación de la especie (Baird *et al.*, 2016). Este método tiene como ventajas que es poco costoso y más informativo que las pruebas de diagnóstico rápido. Sin embargo, este método presenta baja sensibilidad (100 parásitos/ μ l) y requiere de un buen entrenamiento y supervisión a los microscopistas para tener resultados fiables. Adicionalmente a ello, se necesita que los microscopios y los reactivos se encuentren en óptimas condiciones. No obstante, esto no se logra fácilmente en muchas zonas alejadas (Nateghpour *et al.*, 2012).

En estos casos, se recomienda el uso de pruebas de diagnóstico rápido (PDR), las cuales son ensayos inmunocromatográficos que usan anticuerpos contra antígenos del parásito. Las principales ventajas de estas son su fácil operatividad y su adaptabilidad para zonas de difícil acceso puesto que pueden ser almacenadas a temperatura ambiente por varios meses (Rosas-Aguirre *et al.*, 2009). Entre los antígenos que son usados en

estas pruebas se encuentran la proteína rica en histidina tipo 2 (HRP2), lactato deshidrogenasa (LDH) y aldolasa (Kavanaugh *et al.*, 2021).

Para *P. falciparum*, la HRP2 es el antígeno más usado en las PDR, puesto que se produce en todos los estadios de la fase eritrocítica. Con respecto a esta proteína, hay que tener en cuenta que la gran cantidad de polimorfismos en la HRP2 afecta la efectividad de las PDR y que los anticuerpos contra HPR2 también pueden detectar a la proteína rica en histidina tipo 3 (HRP3) por su homología (Baker *et al.*, 2010). Los genes *pfhrp2* y *pfhrp3*, que codifican dichas proteínas, se encuentran en los cromosomas 8 y 13, respectivamente (Poti *et al.*, 2020).

La delección de los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* en *P. falciparum* se ha asociado a falsos negativos en las PDR que usan principalmente anticuerpos contra estas proteínas. El primer reporte de este fenómeno se hizo en muestras de la Amazonía peruana (Gamboa *et al.*, 2010). Diversos estudios demuestran la existencia de esta característica en países de América, África y Asia; aunque Perú tiene mayor prevalencia de delección en ambos genes respecto a otros países endémicos (Gendrot *et al.*, 2019; Thomson *et al.*, 2020).

En Perú, varios trabajos han estudiado las delecciones en *pfhrp2/3* (Tabla 1). Durante el período del 2000 – 2010, la presencia de la delección en *phrp2* fue moderada (21 – 41%), mientras que la de *phrp3* fue mayor (46 – 70%). A partir del 2012, se ha notado un incremento significativo de la doble delección (Valdivia *et al.*, 2012), llegando a cerca del 70% de prevalencia. También se ha reportado dos brotes de *P. falciparum* en Tumbes y Cusco entre 2010 – 2013 donde los parásitos responsables tenían la doble

delección (Baldeviano *et al.*, 2015; Okoth *et al.*, 2016). Todos estos estudios utilizaron la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para determinar la ausencia o presencia de estos genes. En tanto, un estudio reciente utilizó secuenciación de nueva generación y determinó un incremento en la presencia de la doble delección durante el tiempo. Entre 2003 y 2005, se encontró la doble delección en el 25% de las muestras, mientras que entre 2014 y 2018, la proporción aumentó hasta un 69%. Sin embargo, la técnica arrojó resultados inconclusos, especialmente para HRP2 (39% entre 2003 – 2005, 24% entre 2014 – 2018) (Kattenberg *et al.*, 2023).

Tabla 1. Estudios sobre la delección de los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* en la Amazonía peruana.

	Año	N° de muestras	% Delección <i>pfhrp2</i>	% Delección <i>pfhrp3</i>	% Doble Delección	Comentarios
Akinyi <i>et al.</i> , 2013	1998-2001	92	20.7%	-	-	No analizaron <i>pfhrp3</i>
	2003-2005	96	40.6%	-	-	
Baldeviano <i>et al.</i> , 2015	1999-2000	82	76.8%	-	-	No analizaron <i>pfhrp3</i>
Gamboa <i>et al.</i> , 2010	2003-2007	148	41.0%	70.0%	21.6%	
Bendezu <i>et al.</i> , 2022	2009-2010	93	33.3%	53.8%	31.1%	
Maltha <i>et al.</i> , 2012	2010-2011	74	25.7%	45.9%	25.7%	
Valdivia <i>et al.</i> , 2022	2011-2018	324	77.2%	71.6%	67.0%	Incremento significativo de la doble delección luego de 2012
Quispe, 2017	2012-2014	227	53.0%	48.0%	37.0%	
Figueroa, 2023	2013-2017	172	76.7%	63.4%	61.6%	
Kattenberg <i>et al.</i> , 2023	2003-2005	151	43.0%	61.6%	24.8%	Resultados indeterminados: HRP2: 39%, HRP3: 3.3%

2008-2012	68	94.1%	45.6%	42.6%	Resultados indeterminados: HRP2: 2.9%, HRP3: 2.9%
2014-2018	55	76.4%	56.4%	68.9%	Resultados indeterminados: HRP2: 23.6%, HRP3: 3.6%

El diagnóstico molecular de *Plasmodium* ha resultado tener una mayor sensibilidad y especificidad con respecto a los otros métodos descritos. La PCR fue la primera en ser desarrollada y permiten amplificar los genes codificantes de la subunidad menor del 18S rRNA (Berry *et al.*, 2008). Además, el uso adecuado de cebadores (*primers*) permite la identificación de la especie. Posteriormente, se desarrollaron ensayos de PCR en tiempo real (qPCR). Esta técnica permite detectar bajos niveles de parasitemia (hasta 0.5 - 1 parásito/ μ L) en muestras de sangre total y en papel filtro, cuantificar la parasitemia y diferenciar especies (Roth *et al.*, 2012). No obstante, algunas desventajas de las PCR son su alto costo y la necesidad de personal especializado e infraestructura adecuada.

El uso de métodos de amplificación isotérmica es una nueva alternativa para el diagnóstico molecular porque no necesitan de termocicladores, el equipo de mayor costo en las PCR, y pueden adaptarse fácilmente para su uso en el punto de atención al paciente. Entre estas, la amplificación mediada por lazos (LAMP, *Loop-mediated isothermal amplification*) y la amplificación con recombinasa y polimerasa (RPA, *recombinase polymerase amplification*) son las técnicas más aplicadas en el

diagnóstico (Notomi *et al.*, 2000; Piepenburg *et al.*, 2006). La sensibilidad y especificidad de ambos métodos son comparables a las PCR. Se han reportado el uso de LAMP para la detección de *P. falciparum* y *P. vivax* (Nolasco *et al.*, 2021; Serra-Casas *et al.*, 2017; Serra-Casas *et al.*, 2019); mientras que solo se ha desarrollado un ensayo de detección de *P. falciparum* utilizando RPA (Lalremruata *et al.*, 2020). Finalmente, en los últimos años, se ha venido usando la propiedad de corte indiscriminado de la endonucleasa Cas12a, acoplada con amplificación isotérmica, para la detección de diversos organismos, incluyendo *Plasmodium* (Lee *et al.*, 2020).

La guía nacional indica que la microscopía es la técnica principal para diagnosticar malaria (MINSA, 2015); sin embargo, ello no es posible en muchas zonas por distintos factores: dificultades en su implementación, la habilidad de los microscopistas y la alta prevalencia de infecciones submicroscópicas (Rosas-Aguirre *et al.*, 2010).

3.5 Características de las infecciones de malaria en Perú

Una de las principales características de la malaria en el Perú es el reporte de una gran proporción de infecciones asintomáticas o submicroscópicas. En primer lugar, se ha reportado una mayor proporción de infección por PCR que por microscopía. Así, en dos comunidades de Loreto (Cahuide y Lupuna), el porcentaje de infecciones por PCR (7.2%) superó en más de tres veces a lo detectado por microscopía (2.1%) (Rovira-Vallbona *et al.*, 2017), lo cual es más notorio en temporadas de baja transmisión (Rosas-Aguirre *et al.*, 2021). Esta sub-estimación de casos se reporta también en otros estudios en la Amazonía peruana (Rosas-Aguirre *et al.*, 2017; Carrasco-Escobar *et al.*,

2017b). Asimismo, la proporción de infecciones asintomáticas en dichas comunidades fue alta, superando el 70% (Rovira-Vallbona *et al.*, 2017).

La presencia de infecciones asintomáticas y submicroscópicas representan un desafío para la eliminación de *P. vivax*. Las personas con este tipo de infecciones escapan de la vigilancia por el sistema de salud: no acuden a los centros por no sentirse enfermos y si llegan, la microscopía no llega a ser lo suficientemente sensible para diagnosticar (Bousema *et al.*, 2014). En Perú, una gran proporción (70 – 90%) de las infecciones submicroscópicas son también asintomáticas (Rovira-Vallbona *et al.*, 2017; Carrasco-Escobar *et al.*, 2017b). De esta manera, dichas infecciones representan un reservorio de malaria difícil de eliminar y contribuye a su continua transmisión mediante la movilización humana.

La prevalencia de malaria puede ser atribuido a distintos factores: características ambientales y estacionales, socioeconómicas, demográficas (edad, sexo, tipo sanguíneo), entre otras (Aychiluhm *et al.*, 2020). Determinar los factores de riesgo asociados a la infección por malaria puede ayudar a las estrategias de control en los programas nacionales. Dichos factores pueden variar dependiendo del área de estudio y las comunidades analizadas (Ahmed *et al.*, 2020).

En Perú, se han realizado diversos trabajos al respecto. Se han encontrado como posibles factores de riesgo: trabajar fuera de casa, tener historial de viaje previo, vivir en hogares con muchas personas o con paredes incompletas, no disponibilidad de electricidad, edad, sexo, poca distancia a la fuente de agua, uso de mosquiteros, tiempo

de residencia en la comunidad. Estos factores pueden variar dependiendo si se analiza el riesgo a la infección por especie (Rosas-Aguirre *et al.*, 2015; Carrasco-Escobar *et al.*, 2017b).

3.6 Tratamiento y Resistencia a antimaláricos

El tratamiento contra *P. vivax*, denominado cura radical, está dirigido a los estadios sanguíneo y hepático. La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda para casos sin complicaciones el uso de cloroquina por 3 días (CQ; 25 mg/kg/día) si se está en una zona que no registra resistencia a este fármaco. En caso contrario, se recomienda la terapia combinada con artemisina (ACT) y 14 días de primaquina (PQ; 0.25 mg/kg/día), siempre y cuando el paciente no tenga una deficiencia en la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), puesto que podrían desarrollar hemólisis moderada o severa por la primaquina (Baird *et al.*, 2016).

En Perú, como tratamiento de primera línea, se usa CQ por 3 días (10 mg/kg por 2 días y 5 mg/kg en el tercer día) con PQ por 7 días (0.5 mg/kg/día) (MINSA, 2015). Para casos severos, la OMS recomienda aplicar artesunato por al menos un día vía intravenosa o intramuscular hasta que se pueda pasar al tratamiento oral (WHO, 2015).

Desde el 2018, la tafenoquina (TFQ) fue aprobada para su uso contra hipnozoitos y tiene la ventaja de ser administrada en una sola dosis (Tan y Huwang, 2018). Sin embargo, como también puede producir hemólisis por deficiencia en G6PD, se usa en pacientes con al menos 70% de actividad normal de la enzima. Lamentablemente, no es común determinar la proporción de pacientes con deficiencia en G6PD, lo que puede

dificultar su implementación (Lacerda *et al.*, 2019). En Perú, un estudio clínico demostró que la tafenoquina y la primaquina tienen eficacias similares para prevenir relapsos en pacientes sin deficiencia en G6PD (Llanos-Cuentas *et al.*, 2019).

Por otro lado, como tratamiento para *P. falciparum* se hacía uso de CQ; pero debido al incremento en su resistencia, se cambió al uso de sulfadoxina con pirimetamina (SP) entre 1995 y 1999 (Magill *et al.*, 2004). Por la aparición de cepas resistentes a esos fármacos, en concordancia a lo recomendado por la OMS desde el 2001, se cambió a la estrategia con ACT (Durand *et al.*, 2018). Esta terapia consiste en artesunato por 3 días (ART, 4 mg/kg/día) junto con mefloquina por 2 días (MQ, 12.5 mg/kg/día). Una dosis de PQ (0.75 mg/kg) se ha adicionado en el tratamiento desde el 2015 (De Oliveira *et al.*, 2011; MINSA, 2015).

Los estudios de eficacia de tratamiento pueden ser usados para determinar la efectividad de fármacos para *P. falciparum* y *P. vivax*. Adicionalmente, se ha usado ensayos *in vitro* para validar marcadores genéticos asociados a la resistencia a fármacos en *P. falciparum*, siendo los principales *pfert*, *pfdhps*, *pfdhfr*, *pfmdr1* y *pfk13*. (Tabla 2). Evaluar la distribución y presencia de estos marcadores genéticos es importante para discutir sobre la necesidad de nuevos cambios en el esquema de tratamiento (Murmu *et al.*, 2021).

Tabla 2. Genes asociados con resistencia a antimaláricos en *P. falciparum*

(Adaptado de Haldar *et al.*, 2018)

Antimalárico	Marcador genético
Cloroquina	<i>pfcr1, pfmdr1</i>
Pirimetamina	<i>pfdhfr</i>
Sulfadoxina	<i>pfdhps</i>
Artemisinina	<i>pfkelch13</i>
Mefloquina	<i>pfmdr1</i>
Amodiaquina	<i>pfcr1, pfmdr1</i>
Quinina	<i>pfcr1, pfmdr1</i>

La resistencia a CQ en *P. falciparum* se reporta desde finales de los 50, y actualmente está tan distribuida en el mundo que ya no se recomienda en el tratamiento (Butler *et al.*, 2010). En tanto, la resistencia a SP y MQ se ha incrementado desde los años 70 (Wells *et al.*, 2015). Debido al aumento de resistencia, la OMS recomendó la estrategia de ACT, que puede ser adaptado dependiendo de los niveles de resistencia en cada país (WHO, 2015).

Los polimorfismos de nucleótido único (SNP) son la principal causa de resistencia en *P. falciparum*. Para CQ, los SNP en el gen que codifica el transportador de resistencia a cloroquina (*pfcr1*) son la principal fuente de resistencia. Los haplotipos (conjunto de alelos o variantes genéticas que se heredan juntos en bloque) más frecuentemente asociados a la resistencia (entre las posiciones 72 al 76) son SVMNT y CVIET. La mutación K76T es la determinante de la resistencia (Awasthi *et al.*, 2012).

La resistencia a SP es explicada por mutaciones en los genes que codifican para la dihidropteorato sintasa (*pfdhps*) y para la dihidrofolato reductasa (*pfdhfr*). Los SNP en *pfdhps* que generan las mutaciones S436A, A437G, K540E, A581G y A613S están asociadas a la resistencia a sulfadoxina. En tanto, los SNP en *pfdhfr* que producen las mutaciones C50R, N51I, S108N e I164L se asocian a la resistencia a pirimetamina (Jiang *et al.*, 2019). La resistencia se adquiere cuando las mutaciones se acumulan en estos genes. Uno de los haplotipos más comunes y de gran preocupación es el “mutante séxtuple” (posiciones 50, 51 y 108 en *pfdhfr* + posiciones 437, 540 y 581 en *pfdhps*), la cual no solo está asociada a la resistencia a SP, sino también se ha reportado su asociación con bajo peso al nacer en infecciones durante embarazo (Minja *et al.*, 2021).

Los SNP en el gen para la proteína 1 de resistencia múltiple (*pfmdr1*) están asociadas con la resistencia a varios fármacos. Las mutaciones N86Y, D144G, Y184F, S1034C, N1042D y D1246Y (encontradas en los haplotipos NDFCDY y NDFSDD) pueden estar relacionadas a la resistencia a ART, CQ, MQ o AMQ. En particular, la mutación N86Y ha sido asociada a CQ y AMQ (Veiga *et al.*, 2016). Además, la variación en el número de copias (CNV, *copy number variation*) en *pfmdr1* se ha asociado a la resistencia en MQ (Sidhu *et al.*, 2006).

Por su parte, el gen para la proteína kelch13 (*pfk13*) se asocia con la resistencia a artemisina, en especial las mutaciones en el dominio de la hélice (*propeller domain*). Las mutaciones más importantes son Y493H, R539T, I543T y C580Y; las cuales están muy distribuidas en la subregión del Gran Mekong en el sudeste asiático (Imwong *et al.*, 2017). En Sudamérica, solo se han reportado algunos casos de resistencia a ART

en Guyana, asociados a la mutación C580Y (Chenet *et al.*, 2016; Mathieu *et al.*, 2020). De esta forma, la OMS recomienda la continua vigilancia de mutaciones en este gen (WHO, 2017).

Se han realizado estudios de vigilancia molecular de la resistencia a antimaláricos en *P. falciparum* en Perú (Tabla 3). En los inicios del 2000, muchos estudios analizaban pocos marcadores moleculares. De forma general, se ha visto que la frecuencia del haplotipo SVMNT se ha incrementado en el país, probablemente por el uso de CQ en el tratamiento contra *P. vivax* en zonas donde *P. falciparum* también circula (Bacon *et al.*, 2009). Por otro lado, se han incrementado las variaciones en los polimorfismos luego de cambios en el esquema de tratamiento. En ese sentido, la proporción de cepas “mutantes séxtuples” en los genes *pf dhps* y *pf dhfr* causa preocupación (Zhou *et al.*, 2008; Bacon *et al.*, 2009).

Además, algunos estudios de brotes en zonas no endémicas muestran también resistencia a CQ y SP (Baldeviano *et al.*, 2015; Okoth *et al.*, 2016). En los últimos años, dos estudios han reconfirmado la tendencia de cepas multiresistentes para CQ y SP (Villena *et al.*, 2022; Kattenberg *et al.*, 2023). No obstante, ningún reporte de mutaciones en *pfk13* asociadas a resistencia en ART se ha encontrado en Perú hasta el momento (Villena *et al.*, 2022; Kattenberg *et al.*, 2023; Sandoval-Bances *et al.*, 2023). En resumen, los cambios en los marcadores asociados a resistencias varían en el tiempo y en localidad. Por tanto, es necesario realizar una vigilancia continua de los mismos.

Tabla 3. Estudios de vigilancia de marcadores moleculares de resistencia en Perú.

Se muestran los principales haplotipos completos por cada gen. Los aminoácidos en **negrita** representan las posiciones mutadas.

Ubicación	Años	Gen	Principales haplotipos (número de muestras con el haplotipo particular/total de muestras)	Referencia
Iquitos	2000	<i>pfmdr1</i>	CDY (47/97), CDD (33/97)	Pillai <i>et al.</i> , 2003
Padrecocha	1999	<i>pfmdr1</i> <i>pfprt</i>	NFCCD (60/60) CVMNT (30/60), SVMNT (30/60)	Huamán <i>et al.</i> , 2004
Iquitos	2001-2002	<i>pfprt</i>	SMNT (19/31), CMNT (12/31)	Viera <i>et al.</i> , 2004
Alianza Pampa Hermoza	y 2000	<i>pfdhfr</i> <i>pfdhps</i>	CNCSI (23/26) SAKAA (26/26)	Durand <i>et al.</i> , 2007
Ullpayacu	2002	<i>pfdhfr</i> <i>pfdhps</i>	CNCNI (29/29) SAKAA (29/29)	
Iquitos	2005 2006	- <i>pfdhfr</i> <i>pfdhps</i>	CNCNI (141/178), CICNL (30/178) SAKAA (140/167), SGKGA (24/167)	Zhou <i>et al.</i> , 2008
Padrecocha y Caballacocho	1999	<i>pfdhfr</i> <i>pfdhps</i> <i>pfprt</i> <i>pfmdr1</i>	CINL (53/104), CNNI (50/104) SAKKA (50/104), SGEGA (31/104), SGKGA (23/104) SVMNT (56/104), CVMNT (48/104) NDFCDD (45/104), NDFCDY (44/104), NGFSDD (12/104)	Bacon <i>et al.</i> , 2009
Iquitos	2006 2007	- <i>pfdhfr</i> <i>pfdhps</i> <i>pfprt</i> <i>pfmdr1</i>	CNNI (49/62), CINL (10/49) SAKAA (51/62), SGKGA (7/62), SGEGA (4/62) SVMNT (41/62), CVMNT (21/62) NDFCDD (32/62), NGFSDD (18/62), NDFCDY (9/62)	
Tumbes	2010 2011	- <i>pfdhfr</i> <i>pfdhps</i> <i>pfmdr1</i>	SVMNT (18/18) RICNI (18/18) SGEGA (18/18) NDFCDY (18/18)	Baldeviano <i>et al.</i> , 2015
Cusco	2013	<i>pfprt</i> <i>pfmdr1</i> <i>pfdhfr</i> <i>pfdhps</i>	SVMNT (4/4) NDFCDY (4/4) RICNI (4/4) SGEGA (4/4)	Okoth <i>et al.</i> , 2016

Iquitos Mazán	y 2015 2019	-	<i>pfert</i>	SVMNT (60/63), CVMNT (1/63)	Villena <i>et al.</i> , 2022
			<i>pfdhfr</i>	ICNI (59/63)	
			<i>pfdhps</i>	SGEGA (46/63), SAKAA (1/63)	
			<i>pfmdr1</i>	NFY (45/63)	
San Juan Bautista, Mazán, Punchana, Pastaza, Belén y otros	2005 2003	-	<i>pfert</i>	CVMNT (65/141), SVMNT (49/141)	Kattenberg <i>et al.</i> , 2023
			<i>pfdhfr</i>	CNCNI (98/141), CICNI (32/141)	
			<i>pfdhps</i>	SAKAA (80/141), SAEAA (16/141), SGKGA (14/141)	
			<i>pfmdr1</i>	NDFCDD (61/141), NGFSDD (43/141), NDFCDY (17/141)	
	2008 2012	-	<i>pfert</i>	SVMNT (60/68), CVMNT (2/68)	Kattenberg <i>et al.</i> , 2023
			<i>pfdhfr</i>	RICNI (61/68), CICNI (6/68)	
			<i>pfdhps</i>	SGEGA (48/68), SAKAA (4/68)	
			<i>pfmdr1</i>	NDFCDY (60/68), NGFSDD (5/68), NDFCDD (1/68)	
	2014 2018	-	<i>pfert</i>	SVMNT (32/45)	
			<i>pfdhfr</i>	RICNI (44/45)	
			<i>pfdhps</i>	SGEGA (30/45), SAKAA (2/45)	
			<i>pfmdr1</i>	NDFCDY (42/45)	

Por el lado de *P. vivax*, la resistencia a CQ se ha incrementado, sobre todo en países donde esta especie es endémica (Price *et al.*, 2014). Asimismo, se ha reportado fallas en el tratamiento con PQ, aunque no es claro el mecanismo de resistencia (Thomas *et al.*, 2016). Diversos factores pueden afectar la eficacia a los tratamientos, como son: la dificultad de diferenciar los tipos de recurrencia, el poco entendimiento a los mecanismos de acción, entre otros (Ferreira *et al.*, 2021).

La falta de un sistema continuo y robusto para el cultivo de *P. vivax* dificulta los ensayos *in vitro*, por lo que no hay muchos marcadores completamente validados en esta especie. Usualmente, los estudios de vigilancia de marcadores en *P. vivax* se concentran en genes ortólogos a los marcadores en *P. falciparum* (Buyon *et al.*, 2021). De forma particular, mutaciones en *pvdhfr* (F57L, R58K, T61M, S117N, I173L) y *pvdhps* (A383G, A553G) están asociados a resistencia a SP. En Perú, se ha reportado

un incremento en la frecuencia de estos polimorfismos (Flannery *et al.*, 2015; Villena *et al.*, 2022). Asimismo, se han encontrado mutaciones no sinónimas en *pvmdr1* (Y976F, T958M) y mutaciones intrónicas en *pvcr1*, aunque su asociación a resistencia no está claro (Flannery *et al.*, 2015; Villena *et al.*, 2020; Villena *et al.*, 2022).

3.7 Genética de Poblaciones en *Plasmodium*

La genética de poblaciones permite entender los cambios evolutivos mediante la medición de la diversidad genética dentro y entre las poblaciones (Hedrick, 2009; Kanaka *et al.*, 2023). Esta diversidad puede estar influenciado por distintos factores (selección natural, *inbreeding*, deriva génica, flujo genético, mutaciones y recombinación) y en diferentes “direcciones”. Por ejemplo, el flujo genético tiende a aumentar la diversidad; mientras que el *inbreeding*, la disminuye (Hedrick, 2009; Kanaka *et al.*, 2023).

La variabilidad alélica refleja la diversidad genética de una población. La medida más usada para este parámetro es la heterocigocidad esperada (H_e). La H_e es la probabilidad de que dos alelos escogidos al azar en una población sean diferentes. Tiene un rango entre 0 (sin diversidad) y 1 (alta diversidad) (Barrandeguy y García, 2020). Otras medidas son el número de alelos por locus, la riqueza alélica (el número de alelos por locus promedio independiente del tamaño de muestra) y la diversidad nucleotídica (π), que se usa cuando se trabaja con SNP (Li, 2011; Barrandeguy y García, 2020).

Usualmente, las poblaciones de *P. vivax* tienen más diversidad genética que *P. falciparum*. Esto se debe a que la diversidad de *P. falciparum* aumenta conforme se

incrementa el nivel o intensidad de transmisión; mientras que para *P. vivax* no hay una correlación (Auburn *et al.*, 2021). Esto puede explicarse por diversas características biológicas de *P. vivax*, como son la presencia de hipnozoitos, la baja parasitemia, la producción temprana y continua de gametocitos, entre otros (Barry *et al.*, 2015).

El desequilibrio de ligamiento es la asociación no al azar de alelos en diferentes loci (Slatkin, 2008). Una forma de medirlo es con la diferencia de la frecuencia observada y esperada en la población de un haplotipo determinado. Si dicha diferencia es distinta a cero, los alelos involucrados en el haplotipo no están cumpliendo con la ley de segregación independiente de Mendel y por tanto, se dice que están en desequilibrio de ligamiento. El índice de asociación estandarizado (I_A^S) puede ser usado como una medida resumen de estas diferencias (Slatkin, 2008). En zonas de baja transmisión, se incrementa la probabilidad de que los parásitos se autofecunden en el mosquito (autogamia). Con ello, los haplotipos se segregarán juntos y se incrementará el desequilibrio de ligamiento. A este fenómeno se denomina propagación clonal (Escalante *et al.*, 2015).

La conectividad parasitaria describe el flujo de parásitos entre las fuentes de transmisión dentro de un contexto espacial determinado (Guerra *et al.*, 2019). En el caso de malaria, las poblaciones parasitarias son transportadas por el movimiento de los mosquitos y en mayor medida, por el movimiento humano (Guerra *et al.*, 2019). Para medir la conectividad, diversos métodos se han empleado, incluyendo parámetros de diferenciación genética como el índice de fijación, aunque se ha demostrado su utilidad solo a escala geográficas grandes (Taylor *et al.*, 2017). Por ejemplo, en la

Amazonía peruana se ha mostrado conectividad parasitaria de poblaciones de *P. vivax* en comunidades a grandes distancias (Manrique *et al.*, 2019).

A menor escala (por ejemplo, a nivel comunitario), la identidad por descendencia (IBD, del inglés “*identity by descent*”) es una medición efectiva (Fola *et al.*, 2023). Se dice que dos alelos en dos individuos distintos son idénticos por descendencia cuando han sido heredados de un ancestro común (Henden *et al.*, 2018). Al analizar redes de IBD, se puede revelar patrones de relación y conectividad en el espacio y tiempo, como se realizó en poblaciones de *P. falciparum* de Zambia (Fola *et al.*, 2023).

Para el caso de organismos haploides como *Plasmodium*, existe un desafío en el análisis de IBD por las infecciones policlonales, es decir, cuando hay más de una población de parásitos genéticamente distintos en un individuo o muestra. Si bien una forma de lidiar con ello es excluir dicho tipo de infecciones, otra aproximación válida es tratar la información genética como diploide. En caso de que sea homocigoto (es decir, solo un genotipo), se interpreta como una infección monoclonal. Por el contrario, si es heterocigoto (es decir, hay dos genotipos), se interpreta como una infección policlonal. Debido a que en algunos contextos epidemiológicos, hay una alta proporción de infecciones policlonales, esta aproximación nos ayuda a tener un mejor panorama de la conectividad parasitaria (Henden *et al.*, 2018; Kattenberg *et al.*, 2023a).

Cuando en una población se da un apareamiento no aleatorio entre individuos, denominado también aislamiento reproductivo, ocurre una estructuración o subdivisión poblacional (Hedrick, 2009). En el caso de *Plasmodium*, esto puede ser ocasionada por

varios factores: aislamiento geográfico, comportamiento de los vectores y los humanos, entre otros. Identificar los patrones de subdivisión poblacional ayuda a identificar la contribución de estos factores en la ruta de transmisión (Chenet *et al.*, 2012). La estructura poblacional puede ser determinada con el uso de inferencia bayesiana, implementada en softwares como STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000).

El análisis de componentes principales (PCA, *principal component analysis*) también es usado para estudiar estructuración poblacional. El PCA es un análisis multivariado que reduce la dimensionalidad de los datos, conservando la covariancia. De esta forma, construye componentes principales a partir de una combinación lineal de las variables incluidas para explicar la variabilidad de la data. Para genética de poblaciones, dichas variables son datos de SNPs bialélicos (Ma y Amos, 2012). No obstante, se han descrito ciertas limitaciones de la PCA (Privé *et al.*, 2016; Elhaik, 2022).

Por otro lado, el análisis discriminante de componentes principales (DAPC, *discriminant analysis of principal components*) también es usado para estructuración poblacional. El DAPC es una combinación del PCA con el análisis discriminante. Se realiza con grupos predefinidos y se encarga de disminuir la variación dentro de los grupos y maximizar la distancia entre grupos diferentes. Con ello, se podrá evaluar la contribución de los alelos en los primeros componentes principales (Jombart *et al.*, 2010). Aunque también se puede realizar el DAPC para determinar agrupaciones *de novo*, se ha mostrado que no es tan preciso como cuando el agrupamiento es *a priori* (Miller *et al.*, 2020).

Los marcadores moleculares son secuencias de ADN que son afectados por los mismos factores que influyen en la variabilidad genética (Arnott *et al.*, 2012). Los microsatélites y los SNP son los marcadores moleculares más empleados en los estudios de genética de poblaciones de *Plasmodium* (Koepfli y Mueller, 2017).

Los microsatélites son secuencias de ADN repetidas en tándem que se encuentran en todo el genoma. Se caracterizan por ser neutrales, codominantes y muy polimórficos. Este última se debe a errores en el desplazamiento de la polimerasa durante la duplicación, por lo que se añade o se deletiona las unidades de repetición (Viera *et al.*, 2016).

Por su parte, los SNP son cambios en un solo nucleótido cuya frecuencia es mayor a 1% en una población en particular. Se caracterizan por ser ubicuos en el genoma, ser codominantes, fáciles de genotipificar (por ser dos posibilidades en una sola posición) y tener baja diversidad alélica (por poder ser solo hasta 4 nucleótidos) (Udoh *et al.*, 2020).

La cantidad y el tipo de marcadores en los estudios de genética de poblaciones dependerá del objetivo, la diversidad de los loci y la cantidad de muestra (Brito y Ferreira, 2011). Emplear todos los marcadores posibles es poco práctico, lleva mucho tiempo y es costoso para los estudios a gran escala (Casillas y Barbadilla, 2017). Lo más recomendable es utilizar pocos marcadores altamente polimórficos para el seguimiento de infecciones (Grünwald *et al.*, 2017). Asimismo, se debe considerar el

número adecuado de muestras al momento de genotipificar para tener una real representación de la población (Hale *et al.*, 2012).

Se han realizado varios estudios para entender la diversidad genética y la estructura poblacional de *Plasmodium* en la Amazonía peruana (Tabla 4). Con respecto a *P. falciparum*, la diversidad genética de poblaciones en Loreto fue de baja a intermedia; aunque mayor a lo esperado en una zona de baja transmisión (Sutton *et al.*, 2010; Branch *et al.*, 2011).

Tabla 4. Estudios de genética de poblaciones de *Plasmodium vivax* y *P. falciparum* en la Amazonía peruana

Especie	Años	Diversidad Genética	Estructura Poblacional	Referencia
<i>P. falciparum</i>	1999 - 2000	No reporta	5 subpoblaciones	Griffing <i>et al.</i> , 2011
	2003 - 2004	He: 0.581	No reporta	Sutton <i>et al.</i> , 2009
	2003	He: 0.14 – 0.59	6 subpoblaciones	Sutton <i>et al.</i> , 2011
	2003 - 2007	He: 0.33 – 0.38	5 subpoblaciones	Branch <i>et al.</i> , 2011
	1998 - 2006	Hd: 0.69 – 0.86	No reporta	Chenet <i>et al.</i> , 2012
	2015 - 2019	$\pi = 0.02$	Sin estructura	Villena <i>et al.</i> , 2022
	2003 - 2018	He: 0.03 - 0.42	3 subpoblaciones	Kattenberg <i>et al.</i> , 2023
<i>P. vivax</i>	2003 - 2004	He: 0.845	No reporta	Sutton <i>et al.</i> , 2009
	2006 - 2007	He: 0.73	3 subpoblaciones	Chenet <i>et al.</i> , 2012
	2006 - 2008	He: 0.44 – 0.69	6 subpoblaciones	Van den Eede <i>et al.</i> , 2010
	2006 - 2008	No reporta	5 subpoblaciones	Cowell <i>et al.</i> , 2018
	2008	He: 0.49	4 subpoblaciones	Delgado-Ratto <i>et al.</i> , 2014
	2008	He: 0.66 – 0.76	3 subpoblaciones	Delgado-Ratto <i>et al.</i> , 2016

2012 - 2015	He: 0.54 – 0.60	6 subpoblaciones	Manrique <i>et al.</i> , 2019
2015	He: 0.39 – 0.71	7 subpoblaciones	Manrique, 2018
2016 – 2017	He: 0.65 – 0.80	No reporta	Ramirez, 2020
2015 - 2019	$\pi = 0.34$	3 subpoblaciones	Villena <i>et al.</i> , 2022

He: heterocigocidad esperada, Hd: diversidad haplotípica, π : diversidad nucleotídica

En cambio, la diversidad en poblaciones de *P. vivax* es de intermedia a alta, y notoriamente más alta que *P. falciparum* (Cowell *et al.*, 2018; Delgado-Ratto *et al.*, 2016). Además de ello, se reporta una heterogeneidad alta y compleja, en donde diferentes comunidades presentan valores variados de porcentaje de infecciones policlonales y desequilibrio de ligamiento (Delgado-Ratto *et al.*, 2016). También se ha encontrado que hay un bajo nivel de diferenciación entre las comunidades, y que la mayor fuente de variación genética ocurre dentro de las mismas.

Por otro lado, las poblaciones de ambas especies son en su mayoría subestructuradas, reportándose entre 3 y 7 subpoblaciones (Tabla 4). En el caso de *P. falciparum*, a inicios de los 2000s se reportaron 5 subgrupos, que fueron reemplazados por grupos mixtos a finales de los 2000s (Griffing *et al.*, 2011). En años posteriores, se ha visto que si bien hay estructuración de la población, uno de los subgrupos es el que predomina especialmente después del 2012 (Valdivia *et al.*, 2022; Kattenberg *et al.*, 2023). Sin embargo, un estudio reciente reporta una población clonal para *P. falciparum* (Villena *et al.*, 2022).

En estos estudios, se evidencia que la diversidad y estructura poblacional de *Plasmodium* en la Amazonía peruana están influenciadas por el flujo de personas y la distancia geográficas entre las comunidades, eventos como intervenciones de control,

los periodos de colección de muestras en los distintos estudios, entre otros factores (Delgado-Ratto *et al.*, 2016). También, hay que considerar que dichos resultados dependen de los lugares y tiempos de colección de las muestras analizadas en cada estudio.

3.8 Vigilancia y programas de control en malaria

La vigilancia es la colección y análisis de data para su posterior uso en el planeamiento, la implementación o la evaluación de estrategias y políticas en salud pública. En el caso de la malaria, se utiliza en programas de control, desde su planeamiento hasta su evaluación. En ese sentido, se busca controlar, eliminar y evitar una reaparición de la enfermedad (Guirou *et al.*, 2020).

Diferentes herramientas y estrategias deben ser empleados de acuerdo con el nivel de transmisión (Tabla 5). El foco de la vigilancia en fases iniciales con alta transmisión debe ser en estudios a nivel poblacional, mientras que, en fases de eliminación con baja transmisión, se debe enfocar en infecciones individuales (WHO, 2018). De esta forma, mientras más cerca de la eliminación, más necesario se hace hallar patrones de transmisión locales y específicos a distrito e incluso, comunidades (Barry *et al.*, 2015). Sin embargo, la aplicación de estas herramientas y estrategias en los programas de control deben tomar en consideración la costo-efectividad, la operacionalidad y la capacidad de proporcionar información oportuna (Auburn *et al.*, 2021).

Tabla 5. Estrategias recomendadas de acuerdo con el nivel de endemicidad (En base a Auburn *et al.*, 2021).

Alta Endemicidad	Endemicidad Intermedia	Baja Endemicidad
Monitorear el efecto de las intervenciones mediante genética de poblaciones.	Identificar focos de transmisión y la heterogeneidad espacial a nivel regional	Identificar nuevos factores de riesgo y las poblaciones asociadas.
Monitorear la eficacia de tratamiento con estudios clínicos y vigilancia de marcadores.	Determinar la contribución de infecciones asintomáticas y submicroscópicas en la transmisión.	Buscar evidencias de transmisión local mediante serología.
Realizar medidas de control a los vectores	Determinar el nivel de conectividad de transmisión entre comunidades.	Llevar diagnóstico y tratamiento en comunidades residuales.
Asegurar un diagnóstico y tratamiento temprano en individuos sintomáticos	Buscar herramientas para diferenciar recurrencias, principalmente los relapsos.	Identificar casos importados con genotipificación y seguimiento de movilización.

En el Perú, la vigilancia se hace rutinariamente mediante la detección pasiva de casos (PCD, *passive case detection*): pacientes febriles que van a los centros de salud y se diagnostica mediante microscopía. En algunos casos, se utiliza la detección activa de casos (ACD, *active case detection*): búsqueda a nivel comunitario o vivienda en zonas de alto riesgo. Para ello, las brigadas usan PDR para diagnosticar a gran parte de la comunidad (Rosas-Aguirre *et al.*, 2016). La ACD es más efectiva en detectar casos que

la PCD debido a la gran proporción de infecciones asintomáticas y submicroscópicas (Moreno-Gutierrez *et al.*, 2018).

El Proyecto “Control de la Malaria en las Zonas Fronterizas de la Región Andina: Un Enfoque Comunitario” (PAMAFRO), financiado por el Fondo Global, comenzó en el 2005 y tuvo como objetivo reducir la malaria en zonas pobres fronterizas de Perú y otros países (PAMAFRO, 2009). Durante su periodo de duración (2005 al 2011), el programa logró reducir la incidencia de *P. vivax* y de *P. falciparum* de 42.8 a 10.1 casos/1000 personas/año y 14.3 a 2.5 casos/1000 personas/año, respectivamente. No obstante, dicha reducción fue heterogénea geográficamente, siendo más efectivo en sitios donde las intervenciones también fueron realizadas en distritos cercanos (Janko *et al.*, 2023).

Sin embargo, debido a la falta de interés político y de financiamiento, los programas nacionales de control no fueron mantenidos y conllevó un resurgimiento de los casos de malaria en los años posteriores (Rosas-Aguirre *et al.*, 2016; WHO, 2017). Superando esas dificultades, el MINSA lanzó el Plan Malaria Cero (PMC) en el 2017, con la finalidad de eliminar la malaria en la región Loreto en 25 años con un enfoque comunitario e intercultural (MINSA, 2017).

El PMC contemplaba 3 fases: de control, de eliminación y de eliminación residual. En la primera, se buscó disminuir la cantidad de casos clínicos en un 70 a 90% en zonas con alta endemicidad. Para ello, se empleó estrategias como la detección activa de casos, la implementación de mosquiteros tratados con insecticidas y el refuerzo de los

promotores comunitarios de salud. En la segunda fase, el foco será reducir la prevalencia de casos asintomáticos y submicroscópicos mediante el diagnóstico molecular y el uso de estrategias enfocadas de tratamiento en las comunidades reservorio. Finalmente, en la última fase, se utilizarán todas las estrategias antes mencionadas para las zonas con casos residuales (MINSa, 2017).

La primera fase duró 4 años, y para el 2020, el número de casos de Loreto había disminuido en un 75.4% (MINSa, 2021). No obstante, debido a la pandemia del COVID-19, las actividades de control disminuyeron. A su vez, los casos en otras regiones como Amazonas y Junín se incrementaron. En respuesta a ello, el MINSa lanzó el “Plan hacia la eliminación de la malaria 2022-2030”, con el objetivo de implementar estrategias con un enfoque comunitario y lograr disminuir el número de casos en 90% para el 2030. A diferencia del PMC, este nuevo plan abarca todos los distritos que reportaron malaria durante el 2011 – 2020, lo que comprende 319 distritos en 21 regiones del Perú (MINSa, 2022b).

El Plan hacia la eliminación de la malaria contempla 8 objetivos: 1) brindar diagnóstico y tratamiento oportuno, 2) fortalecer el sistema de vigilancia e información, 3) implementar vigilancia y control al vector, 4) promover estilo de vida para prevención, 5) hacer comunicación efectiva sobre la prevención y control, 6) investigar la efectividad de intervenciones, 7) incorporar el plan a nivel regional y local, y 8) monitorear, evaluar y supervisar las actividades del plan. Para ello, el plan requiere de evidencia basada en investigación de forma que se pueda diseñar las estrategias específicas de acuerdo con el nivel de transmisión (MINSa, 2022b).

Similar al PMC, el Plan hacia la eliminación de la malaria tiene 3 fases: de control, de eliminación y de eliminación residual. Actualmente, nos encontramos en la fase 1, cuyo objetivo es disminuir el número de casos en 70% respecto al 2019. Se utiliza estrategias como detección activa y reactiva de casos (respuesta a un o varios casos confirmados, en donde se realiza prueba al grupo poblacional vinculado a tales casos) y la distribución de mosquiteros impregnados con pesticidas en áreas con endemicidad alta y mediana. En la fase 2, que durará 5 años hasta el 2030, se espera lograr el objetivo general: reducción al 90%. Se emplearán como estrategias el uso de pruebas moleculares en masa para diagnosticar y luego brindar tratamiento a pacientes asintomáticos y la ubicación así como eliminación de focos de malaria en zonas de endemicidad mediana y baja. La fase 3 se implementará en 15 años desde el 2030 y sus actividades se detallarán en un nuevo plan en ese año. El foco de esta fase serán los lugares con malaria residual (MINSa, 2022b).

IV. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

A pesar de la implementación de planes de control por parte del MINSA, la malaria sigue estando presente en el Perú, sobre todo en la Amazonía peruana: más de 26 mil casos en 2022, el 84% concentrado en la región Loreto y 85% de casos producidos por *P. vivax* (MINSA, 2022a). El Plan Malaria Cero (2017 – 2020) y el Plan hacia la eliminación de la malaria (2022 – 2030) propusieron reducir los casos de malaria en 70 – 90% (MINSA, 2017; MINSA, 2022b). Si bien se ha registrado una reducción de 75% en los casos en Loreto (MINSA, 2021), existen problemáticas que aún no han sido atendidas y dificultan la eliminación de la enfermedad.

La malaria en las comunidades indígenas es uno de los problemas que establece el nuevo plan de eliminación, puesto que dichas poblaciones son las más afectadas por la enfermedad en el país (MINSA, 2022b). Los 10 distritos con mayor número de casos de malaria corresponden a zonas con población nativa. Si bien el índice parasitario anual (IPA) disminuyó 3.4 veces del 2017 al 2020 (289.6 a 85.1), dicha reducción fue 4 veces menor a la reportada a nivel nacional. Además, se ha incrementado la proporción de casos que aportan estos distritos a nivel nacional: de 60% en 2017 a 75% en 2020 (MINSA, 2022b).

Diversas causas pueden explicar esta problemática. En primer lugar, hay una disparidad en el acceso al sistema de salud entre poblaciones urbanas, rurales e indígenas; lo cual se refleja en una menor atención a los problemas de salud en comunidades nativas (Hernandez-Vásquez *et al.*, 2022). Asimismo, la lejanía geográfica y su difícil acceso (hay zonas donde se tarda más de 1 día en llegar desde Iquitos, la capital de Loreto)

hacen más complicado que las políticas del MINSA lleguen a implementarse. A ello, se debe sumar el distinto contexto cultural, la cual se debe respetar y entender para adaptar la implementación de estrategias en dichas zonas (Del Mastro, 2022). Estas diferencias se han visto con más crudeza durante la pandemia del COVID-19 (Montag *et al.*, 2019; Pesantes *et al.*, 2023).

Por esos motivos, es necesario realizar estudios para entender el estado de la malaria en comunidades indígenas (Fernandez-Miñope *et al.*, 2021). La vigilancia molecular es una de las herramientas que nos permite indagar distintos aspectos sobre enfermedades infecciosas, para luego aplicar dichos conocimientos en estrategias de control (Guirou *et al.*, 2020). A nivel público, no hay esfuerzos actuales para implementar un sistema de vigilancia molecular de la malaria. A nivel de investigación, existen varios estudios al respecto, cuyo foco son la dinámica de transmisión, reporte de brotes, búsqueda de marcadores moleculares de resistencia, entre otros. No obstante, la gran mayoría se concentra en comunidades peri-urbanas o rurales de fácil acceso (por ejemplo, en Delgado-Ratto *et al.*, 2016). Algunas comunidades remotas son consideradas, pero no son compuestas enteramente por población indígenas (por ejemplo, en Manrique *et al.*, 2019). Solo se ha reportado estudios epidemiológicos de malaria en poblaciones indígenas de Amazonas (Montenegro *et al.*, 2021; Sandoval-Bances *et al.*, 2023), mas no en Loreto.

En ese sentido, esta tesis propone un estudio de vigilancia molecular de los parásitos de malaria en Nueva Jerusalén, una comunidad indígena Achuar de la Amazonía peruana, para comprender el estado de la enfermedad en esta zona y compararlo con otras áreas remotas/indígenas de Loreto. Se estudió la dinámica de transmisión, los

marcadores moleculares de resistencia y las deleciones en los genes *pfhrp2/3* haciendo uso de plataformas de secuenciación de nueva generación (ensayos AmpliSeq) y técnicas de genotipificación clásica.

V. OBJETIVOS

5.1 Pregunta de investigación

¿Cuáles son las características genéticas (dinámica de transmisión, marcadores moleculares de resistencia y ausencia de *pfhrp2/3*) de las poblaciones de *Plasmodium vivax* y *P. falciparum* en la comunidad de Nueva Jerusalén (NJ) y otras zonas remotas de la Amazonía peruana?

5.2 Objetivo general

Caracterizar genéticamente las poblaciones de *Plasmodium* sp en la comunidad nativa de Nueva Jerusalén (NJ) desde noviembre 2019 a mayo 2020 mediante técnicas de vigilancia molecular.

5.3 Objetivos específicos

- a) Analizar la dinámica de transmisión de *P. vivax* y *P. falciparum* en NJ.
- b) Comparar las poblaciones de *P. vivax* y *P. falciparum* de NJ y otras comunidades remotas de la Amazonía peruana.
- c) Determinar la presencia de mutaciones asociadas a resistencia contra antimaláricos de *P. falciparum* y *P. vivax* en NJ y otras comunidades remotas de la Amazonía peruana.
- d) Estimar la frecuencia de la delección de los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* en NJ y otras comunidades remotas de la Amazonía peruana.
- e) Comparar la resolución genética de los ensayos AmpliSeq versus microsatélites en la genotipificación de *Plasmodium* en la Amazonía peruana.

VI. METODOLOGÍA

6.1 Sitios de estudio y Colección de muestra

Nueva Jerusalén (distrito de Trompeteros, provincia de Loreto; 2°50'12.4"S 76°11'29.8"O) es una comunidad indígena Ashuar remota en la Amazonía peruana (Fig. 2). Se encuentra a más de 340 km de la ciudad de Iquitos, capital de Loreto, y cerca de la frontera con Ecuador (aprox. 50 km). El principal acceso es recorriendo 350 km (2-3 días en bote o 1h en helicóptero) desde Iquitos hasta el distrito de Andoas (provincia de Datem del Marañón), y luego 25 km por camino trocha por aproximadamente 4h. La población de NJ es de 521 personas (considerando la comunidad anexa Nueva Nazareth) y cuenta con un puesto de salud nivel I-1 (con técnico de laboratorio, obstetra y médico). La gente de NJ usa madera para la construcción de sus casas y vive en un clima tropical cálido y húmedo durante todo el año. En estas condiciones, la comunidad reporta una transmisión persistente de malaria con picos irregularmente distribuidos a lo largo del año.

En colaboración con las autoridades del MINSA, se recolectaron muestras en NJ por detección activa (ACD, del inglés *active case detection*) y pasiva (PCD, del inglés *passive case detection*) de casos. Primero, se realizaron 3 intervenciones consecutivas de ACD (convocatoria voluntaria de personas presentes en la comunidad) en intervalos de 7 días (fines de noviembre de 2019 a principios de diciembre de 2019). El ACD se dio en el marco de las intervenciones del Plan Malaria Cero. Nuestro estudio brindó el personal de campo y las actividades se llevaron a cabo junto con el personal de la posta de NJ. Además, la recolección de PCD (personas sintomáticas que acuden al puesto de

salud) se llevó a cabo desde diciembre de 2019 hasta mayo de 2020 (código SIDISI: 102725). Por problemas logísticos, la PCD no se realizó en todo el periodo de estudio, en particular, en enero de 2020. Se recolectaron muestras de sangre para la detección microscópica en el puesto de salud local por microscopistas expertos, y para el diagnóstico molecular posterior en nuestro laboratorio en Lima. Para el diagnóstico por microscopía, se realizaron los métodos de la gota gruesa (6 – 7 μ l de sangre) y frotis (3 – 3.5 μ l de sangre). Para el diagnóstico molecular, se colectaron 3 gotas de sangre (6 – 7 μ l cada gota) por punción. Se brindó tratamiento a cualquier infección detectada por microscopía, independientemente de los síntomas, siguiendo las guías nacionales (MINSA, 2015). Debido a la gran movilidad de los habitantes de NJ, no siempre se aseguró el cumplimiento del tratamiento.

A modo de comparación, también se utilizaron muestras previamente recolectadas en otras áreas remotas (Fig. 2). El distrito de Mazán se encuentra a 55-60km de Iquitos (1h en lancha), y está rodeada por los ríos Mazan y Napo. La agricultura, la madera y la pesca son las principales actividades económicas (Carrasco-Escobar *et al.*, 2016; Montenegro-Gutierrez *et al.*, 2018). Se recolectaron muestras de Mazán mediante dos censos transversales a toda población en 8 comunidades en julio y octubre de 2018 (Villasis *et al.*, 2021; Rosado *et al.*, 2022).

Santa Emilia es una comunidad remota ubicada a unos 120 km de Iquitos. La ruta de acceso es viajando desde Iquitos hasta la ciudad de Nauta (4h en bus), y luego 144 km por viaje fluvial durante 12 h. Aunque la agricultura es la principal actividad económica, la gente suele ir a Nauta para el trueque (Manrique *et al.*, 2019). Las

muestras de esta comunidad fueron recolectadas por PCD y ACD de marzo a mayo de 2016 (código SIDISI: 101518).

Por otro lado, el distrito de Andoas (provincia de Datem del Marañón) está ubicado a más de 360 km de Iquitos, muchas comunidades están rodeadas por el río Pastaza. Allí viven poblaciones indígenas de los grupos lingüísticos Achuar y Quechua Achuar. Se recolectaron muestras en Andoas mediante ACD entre septiembre y octubre de 2018 (código SIDISI: 102725).

Finalmente, el distrito de Yavarí (provincia Mariscal Ramón Castilla) se encuentra a 364 km de Iquitos, y está rodeado por el río Yavari. En particular, la comunidad de Islandia forma parte de la “Triple frontera” entre Perú, Colombia y Brasil. El camino de acceso desde Iquitos es fluvial (12h, disponible interdiariamente). Las muestras de Yavarí fueron recolectadas por PCD en diciembre de 2018 (código SIDISI: 102725).

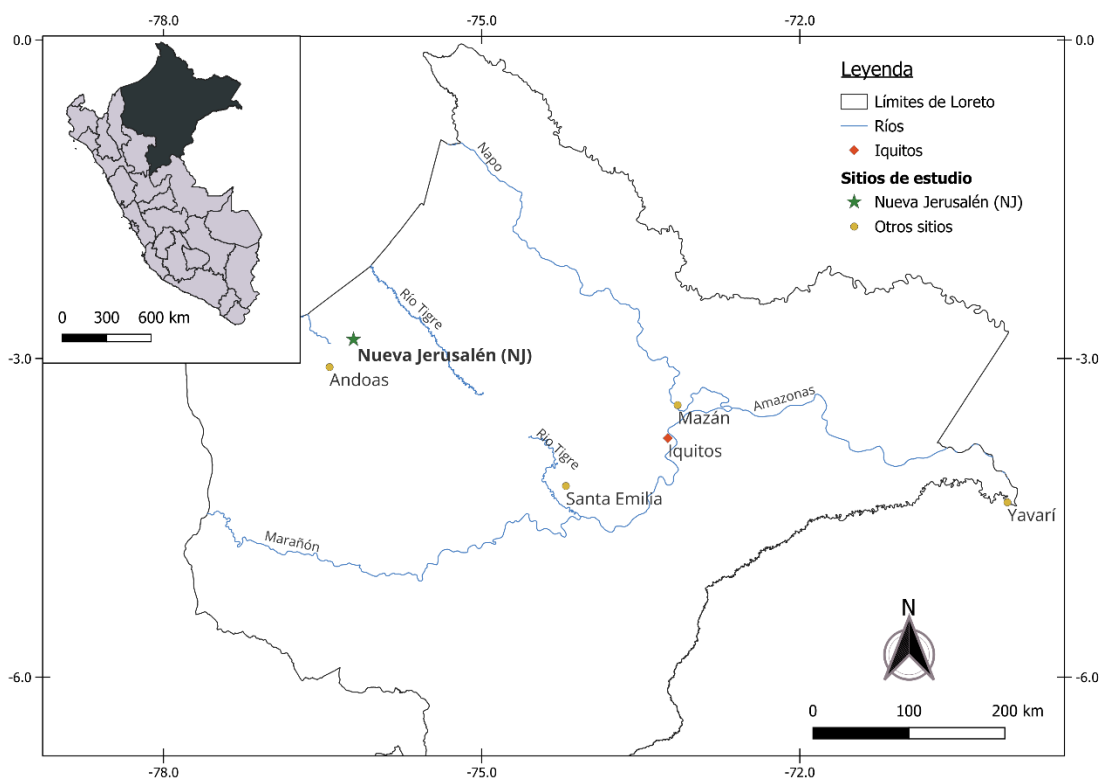


Figura 2. Sitios de estudio. El mapa muestra las 5 áreas que se analizan en este estudio. Nueva Jerusalén (NJ, en negrita) fue la comunidad principal en este trabajo.

6.2 Aspectos Éticos

Las muestras analizadas provinieron de dos estudios previos: i) estudio VLIR-TEAM “Esfuerzos conjuntos para la eliminación de la malaria en la Amazonía peruana” (NJ, Andoas y Yavarí) y ii) estudio Amazonia ICEMR 2.0 “P1 - Dinámica de Transmisión de Malaria Residual y Re-Emergente en la Amazonia: Definiendo las Rutas Hacia la Eliminación de La Malaria” (Mazán y Santa Emilia). Ambos proyectos fueron aprobados por el Comité de Ética Institucional de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH, códigos SIDISI: 102725 y 101518, respectivamente).

En el primer estudio, las muestras fueron recolectadas como parte de las intervenciones del MINSA para el diagnóstico y tratamiento de casos de malaria. Si bien no fue necesario requerir el consentimiento informado de manera individual por ser parte de la vigilancia rutinaria, se pidió el consentimiento al Apu (líder de la comunidad) para la toma de muestras y el establecimiento del equipo de investigación. Las muestras recolectadas por el equipo del MINSA fueron transferidas a nuestro grupo con fines de investigación. Para el segundo proyecto, se obtuvo el consentimiento informado de todos los sujetos.

En ambos casos, los proyectos contemplan el uso futuro de las muestras para nuevos estudios genéticos de los parásitos, como es el caso de este trabajo. Finalmente, esta tesis también fue aprobada por el Comité de Ética Institucional de la UPCH (código SIDISI: 207543).

6.3 Muestras de estudio

Para el cálculo del tamaño de muestra, se consideró una frecuencia alélica menor (MAF) de 0.01, una precisión de 2% y un nivel de confianza del 95% (Kattenberg et al., 2023a) y se calculó la cantidad de muestras a analizar (Hajian-Tilaki, 2014):

$$n = \frac{Z^2(MAF)(1 - MAF)}{d^2} = \frac{1.96^2(0.01)(1 - 0.01)}{0.02^2} = 95.07$$

Es decir, se necesitarían 96 muestras positivas de cada especie para cada localidad. Para los ensayos de secuenciación, se requiere que la parasitemia sea mayor a 5 parásitos/ μ l. No obstante, la cantidad de muestras disponibles en cada zona no siempre

llegaba a lo calculado anteriormente. Además, debido al costo de la secuenciación, solo fue posible realizar un ensayo por cada especie, lo cual incluye aproximadamente 90 muestras por cada especie. Por estos motivos, se decidió realizar un muestreo por conveniencia de acuerdo a la cantidad de muestras disponibles.

Debido a que se quiso comparar diferencias durante el tiempo de estudio en NJ, se decidió escoger 70 muestras de *P. vivax* y 58 muestras de *P. falciparum*, lo cual representa el 34% y 74%, respectivamente, de las muestras disponibles en cada localidad (Tabla 6). Para el resto de lugares, el porcentaje de muestras analizadas respecto a las disponibles varió entre 10% (*P. falciparum* en Santa Emilia) y 100% (*P. vivax* en Yavarí). El detalle del número de muestras está detallado en la Tabla 6.

Posterior a la secuenciación, se realizó un filtro de control de calidad de datos, lo cual está descrito en la sección 6.6.

Tabla 6. Número de muestras utilizadas en los ensayos AmpliSeq por especie y localidad. Se muestran la localidad, el año y método de colección, el número de muestras disponibles por cada lugar, el número de muestras incluido en cada ensayo y el número de muestras que pasaron los filtros de calidad. Para NJ, se detallan los subgrupos considerados para cada especie.

	Lugar	Año de colección	Método de colección	N° muestras analizadas/N° muestras disponibles (%)	N° muestras post filtros/N° muestras analizadas (%)
<i>P. vivax</i>	Nueva Jerusalen (NJ)			70/204 (34.3%)	68/70 (97.1%)
	ACD 1 – 2019			13/26 (50%)	13/13 (100%)
	ACD 2 – 2019	2019	ACD	21/41 (51.2%)	19/21 (90.5%)
	ACD 3 – 2019			16/32 (50%)	16/16 (100%)
	PCD 2020	2020	PCD	20/105 (19%)	20/20 (100%)
	Mazan	2018	Censo	16/56 (28.6%)	13/16 (81.2%)
	Yavari	2018	PCD	36/36 (100%)	20/36 (55.6%)
	Total			122/296 (41.2%)	101/122 (82.8%)
<i>P. falciparum</i>	Nueva Jerusalen (NJ)			64/86 (74.4%)	58/64 (90.6%)
	Nov 2019	2019	ACD	9/9 (100%)	7/9 (77.8%)
	Dec 2019			8/10 (80%)	7/8 (87.5%)
	Feb 2020	2020	PCD	31/44 (70.5%)	29/31 (93.5%)
	Mar 2020			9/13 (69.2%)	9/9 (100%)
	Abr-May 2020			7/10 (70%)	6/7 (85.7%)
	Mazan	2018	Censo	10/12 (83.3%)	9/10 (90%)
	Santa Emilia	2016	ACD & PCD	12/119 (10.1%)	12/12 (100%)
	Andoas	2018	ACD	4/5 (80%)	4/4 (100%)
	Total			90/222 (40.5%)	83/90 (92.2%)

6.4 Procesamiento de muestras

Se extrajo el ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de muestras de sangre en papel de filtro (dos discos de 6 mm² o una porción de 8 x 9 mm²) o muestra de paquete globular (40 ul, solo Mazán) utilizando el EZNA® Blood DNA kit (Omega Bio-tek, EE.UU.), siguiendo las indicaciones del fabricante. El volumen de elución fue de 50 ul en todos los casos. El ADN se almacenó a -20°C hasta su uso.

El diagnóstico molecular se realizó mediante diferentes protocolos de PCR en tiempo real. Las muestras de Mazán, Andoas y Yaraví fueron diagnosticadas utilizando un protocolo modificado de Mangold (Mangold *et al.*, 2005). Este ensayo se basa en la detección por SYBR Green y la identificación de especies por temperatura de fusión (T_m).

Por otro lado, se utilizó el protocolo de Rougemont (Rougemont *et al.*, 2004) en muestras recolectadas en NJ en 2020 y Santa Emilia. Este se basa en sondas TaqMan específicas para cada especie.

Finalmente, el resto de las muestras de NJ (recolectadas en 2019) se diagnosticaron mediante el protocolo de Pincelli (Pincelli *et al.*, 2018). En primer lugar, se utilizaron los cebadores (*primers*) externos del protocolo de Rougemont en una PCR en tiempo real basada en SYBR Green. Posteriormente, se realizó la PCR en tiempo real con las sondas Taqman del protocolo de Rougemont solo con infecciones positivas en la primera reacción. Este doble paso sirve para reducir costos.

Para asegurar la calidad del ADN para la secuenciación (realizada en 2022), se volvió a extraer el ADN con el EZNA® Blood DNA Mini kit y se realizó el protocolo de

Mangold en todas las muestras utilizadas en los ensayos AmpliSeq. Estos procedimientos se realizaron hasta una semana antes de la preparación de las bibliotecas de ADN (librerías).

6.5 Ensayos AmpliSeq

Para realizar la vigilancia molecular de las muestras de malaria, se utilizó los ensayos AmpliSeq de *P. falciparum* (Pf AmpliSeq Peru, Kattenberg *et al.*, 2023a) y *P. vivax* (Pv AmpliSeq Peru, Kattenberg, *et al.*, 2023b), desarrollados en el Instituto de Medicina Tropical de Amberes. Esta plataforma se basa en la secuenciación por amplicones y se acopla al equipo MiSeq (Illumina). La Tabla 6 muestra la cantidad de muestras por localidad y especie que se usaron en cada ensayo.

En resumen, dos PCR múltiplex generan centenas de amplicones que abarcan varias regiones de interés. Para *P. vivax*, el ensayo da información de 227 amplicones para 11 genes putativos asociados a resistencia (*pvcrt*, *pvmrp1*, *pvdmt2*, *pvdhfr*, *pvmadr1*, *pvp13k*, *pvaabc-e1*, *pvk13*, *pvmadr2*, *pvdhps*, *pvmrp2*), un código de barras (*barcode*) de 40 SNPs específicos a Perú para análisis de genética de poblaciones, un segundo *barcode* de 33 SNPs globales para la predicción de origen – útil para infecciones importadas, y regiones del gen del antígeno de membrana apical 1 (*pvama1*) (Kattenberg, *et al.*, 2023b).

En el caso de *P. falciparum*, el ensayo incluye 233 amplicones que abarcan 13 genes asociados a resistencia (*ap2-mu*, *coronin*, *crt*, *cytochromo b*, *dhfr*, *dhps*, *exonuclease*, *k13*, *mdr1*, *mrp1*, *plasmepsin II*, *23S rRNA*, *ubp-1*), un *barcode* de 28 SNPs específicos a Perú para análisis de genética de poblaciones y los genes *pfhrp2/3*. Adicionalmente,

se incluyeron amplicones que cubren el gen del antígeno de membrana apical 1 (*ama1*) y el gen conservado de la proteína de membrana de *Plasmodium* (*cpmp*) (Kattenberg *et al.*, 2023a).

De estos genes, el *ama1* y el *cpmp* están sujetos a presión de selección debido a su interacción con el sistema inmune debido a su localización en la membrana (Lerch *et al.*, 2017). No se ha encontrado evidencia de presión de selección en los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* en la Amazonía peruana (Figueroa Ildefonso, 2023), aunque sí se ha reportado huellas de selección en estos genes en África (Feleke *et al.*, 2021). De forma similar, no hay evidencia de selección en genes asociados a resistencia en genomas de muestra recientes de Perú (Figueroa Ildefonso, 2023), pero sí se ha encontrado en muestras de Sudamérica (Carrasquilla *et al.*, 2022) y África (Muiruri *et al.*, 2018). Los *barcodes* de SNPs de ambos ensayos se encuentran en regiones neutrales. Para seleccionar dichos SNPs, primero se filtraron SNPs neutrales y sin desequilibrio de ligamiento, con un MAF entre 0.35 y 0.5, de genomas de parásitos de Perú disponibles públicamente. Luego, se seleccionaron SNPs que tuvieron la mayor contribución para diferenciar clusters a nivel regional usando análisis discriminante de componentes principales o DAPC. Finalmente, se eligieron entre 2 a 3 SNPs por cromosoma para armar los *barcodes* (Kattenberg, *et al.*, 2023a, Kattenberg, *et al.*, 2023b).

La cobertura de los ensayos AmpliSeq es 59815 pb para *P. vivax* y 57445 pb para *P. falciparum*, lo cual representa el 0.223% y 0.246% de los genomas de cada especie, respectivamente.

La preparación de librería de los ensayos Pv y Pf AmpliSeq se realizó como se describió anteriormente (Kattenberg *et al.*, 2023c), utilizando el kit AmpliSeq Library

PLUS for Illumina (Illumina), el diseño AmpliSeq Custom Panel y los índices AmpliSeq CD (Illumina). En resumen, en una semana de trabajo, cada muestra (7,5 ul de ADN) se amplificó mediante PCR utilizando dos paneles de *primers* diferentes. Luego, los productos de amplificación se mezclaron y digirieron parcialmente con el reactivo FuPa, que también digiere completamente los dímeros de *primers*. Después de eso, se agregaron los AmpliSeq CD Indexes (Illumina) para ligarlos. Esto permite conectar los adaptadores de Index 1 (i7) e Index 2 (i5) a cada muestra.

Para los pasos posteriores, se realizó un paso de lavado con los Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter). Una vez lista, la librería fue amplificada por PCR y se lavó nuevamente para eliminar el ADN genómico y los *primers* usados. Posteriormente, se cuantificó la librería amplificada utilizando el Qubit High Sensitivity DNA kit (Invitrogen). Las librerías de cada muestra se diluyeron a 2 nM con el *buffer* Tris-EDTA y se mezclaron, utilizando el mismo volumen para cada biblioteca, para formar un *pool*. Finalmente, se realizó la desnaturalización con NaOH y se diluyó aún más hasta una concentración final de 7 pM y se agregó PhiX spike-in (Illumina) al 1 % (Pv) o al 5 % (Pf) como control de la secuenciación. El pool final fue cargado en el equipo MiSeq para la secuenciación *pair-end* de 2 x 300 ciclos usando el MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina).

Los archivos FASTQ generados en el MiSeq fueron procesados en un algoritmo de análisis basado en el sistema operativo Unix. En resumen, se realizó un control de calidad de los archivos FASTQ con el programa FastQC (Andrews, 2010) y se generó un reporte QC utilizando el paquete para R *fastqcr*. Luego, se eliminaron los indexes ligados y los *reads* de baja calidad con el programa Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014).

Después, los *reads* procesados se alinearon con el genoma de referencia (PvP01 versión 46 para *P. vivax* o Pf 3D7 versión 44 para *P. falciparum* del PlasmoDB) con el programa Burrows-Wheeler aligner (Li y Durbin, 2009). Los estadísticos del alineamiento fueron generados usando el Picard's CollectAlignmentSummaryMetrics.

Posteriormente, las variantes (SNPs e indels) fueron identificadas con el programa HaplotipoCaller del Genome Analysis Toolkit - GATK (McKenna *et al.*, 2010), generando un archivo gVCF para cada muestra. Con GenomicsDBimport y GenotypeGVCFs del programa GATK, se llamaron los genotipos. Luego, se realizó un *hard filtering* para las variantes determinadas utilizando el QUAL score con SelectVariants del programa GATK y las variantes que lograron pasar fueron anotadas con SnpEff (Cingonali *et al.*, 2012).

La profundidad de cobertura por locus se utilizó para calcular la mediana de la profundidad de todos los loci por muestra, por locus o por amplicón. La cobertura alineada se calculó como el número de bases que pasaron los filtros dividido por el número total de bases involucradas en el ensayo AmpliSeq (59815 pb para *P. vivax* y 57445 pb para *P. falciparum*).

6.6 Criterios de inclusión para el análisis

Para los análisis posteriores, se seleccionaron 101/122 (82.8%) muestras para *P. vivax* y 83/90 (92.2%) muestras de *P. falciparum* usadas en el ensayo AmpliSeq (Tabla 6). Estas muestras tuvieron buena calidad de datos (cobertura media > 15 *reads*/posición, < 35% de genotipos perdidos para *P. falciparum* y < 25% para *P. vivax*).

6.7 Análisis de datos

Para determinar la complejidad de infección, se calculó el estadístico F_{ws} (heterocigosidad intra-muestra) utilizando el paquete de R *moimix* (Lee y Bahlo, 2016). Se consideró infección monoclonal cuando el $F_{ws} \geq 0,95$. Para este cálculo, se incluyeron todas los SNPs bialélicos detectados en el ensayo AmpliSeq.

Para proporcionar información sobre la dinámica de transmisión de *P. vivax* y *P. falciparum* dentro de NJ, se realizaron diversos análisis de genética de poblaciones. La diversidad genética se expresó como heterocigosidad esperada (H_e) y se calculó utilizando el paquete *adegenet* (Jombart *et al.*, 2011). La H_e fue calculada con la siguiente fórmula: $H_e = \frac{1}{K} \sum_{k=1}^K (1 - \sum_{i=1}^{m(k)} f_i^2)$, donde $m(k)$ es el número de alelos del locus k , K es el número de loci y f_i es la frecuencia alélica del alelo i para la población dada (Jombart *et al.*, 2011). La diferenciación genética se midió con el índice de fijación (F_{st} , Weir y Cockerham, 1984) usando el paquete *hierfstat* (Goudet *et al.*, 2022). El F_{st} se calculó de forma pareada, es decir, por cada par de poblaciones. Se utilizaron las posiciones no fijadas de los *barcodes* de SNPs respectivos de cada ensayo AmpliSeq (15-17/28 para *P. falciparum* y 36-38/40 para *P. vivax*) para calcular la diversidad y diferenciación genética. Debido a la neutralidad de los SNPs del barcode y su distribución en el genoma, estos pueden servir como marcadores útiles para análisis de genética de poblaciones como los aquí mencionados. También se realizó los cálculos de diversidad considerando todos los SNPs bialélicos, considerando algunos

genes que pueden estar en presión de selección (*ama1* y *cpmp*). Los patrones de diversidad no cambiaron al compararlo con los resultados obtenidos solo con el *barcode* de SNPs. Esto es debido a que, a pesar que las regiones bajo presión de selección suelen tener bajos niveles de diversidad (Labbé *et al.*, 2023), el proporción de SNPs en presión de selección en los ensayos AmpliSeq no fue alta en comparación a los SNPs en regiones neutrales (Kattenberg *et al.*, 2023) como para influir los valores de diversidad.

Para investigar la estructura poblacional, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) utilizando la función *prcomp* del paquete *stats* y un análisis discriminante de componentes principales (DAPC) con el paquete *adegenet* en R (Jombart *et al.*, 2010). El PCA se realizó con la matriz de frecuencias alélicas de genotipos. Previo al análisis, los genotipos faltantes fueron reemplazados por la frecuencia alélica promedio del locus para todas las muestras. El DAPC se realizó con una validación cruzada, es decir, el análisis se llevó a cabo con un set de entrenamiento, formado por el 90% de las observaciones, y luego este se usa para predecir los grupos en el resto de observaciones (Jombart *et al.*, 2010). Todas las variantes (SNP e indels) se incluyeron para realizar el PCA y DAPC.

Para medir la identidad por descendencia (IBD) por cada par de muestras, los archivos de formato PED y MAP para todas las variantes fueron creados utilizando VCFtools. Posteriormente, se calculó el IBD compartido entre pares de muestras utilizando el paquete *isoRelate* en R (Henden *et al.*, 2018). La distancia genética se calculó utilizando una media estimada del tamaño de unidad de mapa de *Plasmodium chabaudi* de 13,7 kb/centimorgan (cM) (Martinelli *et al.*, 2005; Rovira-Vallbona *et al.*, 2021)

para *P. vivax*, y de 17.141 kb/cM para *P. falciparum* (Su *et al.*, 1999; Henden *et al.*, 2018). Se estableció como umbrales de IBD en el número mínimo de SNP ($n = 10$) y la longitud de los segmentos de IBD (1000 pb). Estos parámetros son usados para reducir falsos positivos con un error de 0,001. Finalmente, se crearon redes de IBD compartido entre muestras usando el paquete *igraph*. Se consideró un umbral de IBD compartido de 90% para *P. vivax* y de 45% para *P. falciparum*. No se pudo encontrar muestras de *P. falciparum* con IBD mayor a 45% debido a la menor diversidad genética de esta especie. Es decir, dos nodos unidos por una línea indica que esas dos muestras tienen un IBD compartido de al menos 90% para *P. vivax* y 45% para *P. falciparum*. Para determinar las relaciones filogenéticas entre las muestras, se construyeron árboles utilizando el método de unión de vecinos (*neighbour-joining*) con la función *njs* del paquete *ape* en R (Paradis y Schliep, 2019). El método de unión de vecinos es eficiente y rápido incluso con una gran cantidad de datos (Criscuolo y Gascuel, 2008). Se utilizó la matriz de distancia Euclideana obtenida con todos los SNP bialélicos de las muestras de Nueva Jerusalén que pasaron los filtros de calidad de secuenciación. Para el caso de *P. falciparum*, se utilizaron 955 loci en 58 secuencias. En tanto, para *P. vivax*, se incluyeron 2904 loci en 68 secuencias. Los árboles filogenéticos se visualizaron en Microreact (Argimon *et al.*, 2016).

6.8 Marcadores de resistencia

En este estudio, se utilizaron listas de variantes de interés en genes asociados (o potencialmente asociados) con resistencia a fármacos para *P. vivax* y *P. falciparum*, creadas originalmente mediante búsqueda bibliográfica (Kattenberg *et al.*, 2022;

Kattenberg *et al.*, 2023). Los haplotipos se crearon combinando genotipos de las principales variantes de interés en cada gen.

6.9 Genotipificación de los genes *pfhrp2/3*

La presencia o ausencia de los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* se determinó mediante el ensayo Pf AmpliSeq (Kattenberg *et al.*, 2023a) y mediante PCR (Akinyi *et al.*, 2013). El protocolo de PCR constaba de 2 pasos. En primer lugar, se realizaron PCR separadas que amplificaban los genes *msp1*, *msp2* y *glurp* como control de calidad del ADN (Snounou *et al.*, 1999). Las muestras que amplificaron al menos 2 de estos genes pasaron a la segunda parte, donde se amplificó el exón 2 de los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* por separado mediante PCR (Quispe, 2017). En ambos pasos, la visualización de los amplicones se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa. La presencia o ausencia de la banda correspondiente determinaba el resultado final. El ADN de las cepas 3D7 (*pfhrp2+*, *pfhrp3-*), Dd2 (*pfhrp2-*, *pfhrp3+*) y HB3 (*pfhrp2+*, *pfhrp3-*) se utilizó como control. También se incluyeron ADN de donante sano y control sin reacción. Finalmente, los resultados obtenidos por el ensayo AmpliSeq y PCR fueron comparados.

6.10 Genotipificación por microsatélites

Para comparar la resolución genética del *barcode* de SNP en los ensayos AmpliSeq, las muestras usadas en estos ensayos también fueron amplificadas por microsatélites (MS). Para *P. vivax*, se utilizó un set de 16 MS previamente desarrollado en el Laboratorio de Malaria de UPCH (Manrique *et al.*, 2019). La amplificación de cada

marcador se realizó mediante PCR convencional. En cada uno, uno de los *primers* fue marcado con un fluoróforo para su posterior identificación. El *master mix* estaba compuesto por 1U de la enzima AccuStart II Taq DNA polymerase (QuantaBio), 2.5 μ L de Buffer de PCR, 1.5 mM MgCl₂, 200–400 nM de cada primer (dependiendo del marcador) y 2.5 μ L de ADN. El protocolo de amplificación consistió de una denaturación inicial de 95°C por 5 min, seguido de 40 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 55–67°C (dependiendo del MS) y 30s a 72°C. El último paso fue una extensión final a 70°C por 15 min. (Manrique *et al.*, 2019). Para ello, las muestras se clasificaron según la cantidad de parásitos/ul. Aquellas muestras con más de 24 par/ul fueron diluidas hasta 8 - 10 par/ul para ser usadas directamente en los PCR. En tanto, las muestras entre 1.5 y 24 par/ul fueron re-amplificadas mediante una amplificación selectiva de genoma completo (sWGA) usando la enzima phi29 DNA Polymerase (NEB). Finalmente, muestras por debajo de 1.5 par/ul no fueron utilizadas. De esta forma, se utilizaron 56 muestras de NJ (38 de NJ 2019 y 18 de NJ 2020) y 6 muestras de Mazán.

En el caso de *P. falciparum*, se utilizó un set de 7 MS desarrollados en el Malaria Branch, Division of Parasitic Diseases and Malaria del Centro de Control de Enfermedades (CDC) de EEUU (Roper *et al.*, 2003; Nair *et al.*, 2003). Este panel de MS ha sido anteriormente usado en muestras peruanas (Ayinki *et al.*, 2013; Bendezu *et al.*, 2022). Similar a *P. vivax*, la amplificación de los MS se realizó usando PCR convencional con uno de los *primers* marcados. El master mix estaba compuesto por 1X del Promega Master-mix (Promega), 400 nM de cada primer y 2 μ l de ADN o 1 μ l del producto de la primera PCR (dependiendo del marcador). Se utilizaron hasta 3 protocolos de amplificación, tanto PCR directo como semi-nested (Roper *et al.*, 2003;

Nair *et al.*, 2003). En este caso, se usa el ADN directamente proveniente de la extracción (sin dilución o re-amplificación como sucede con *P. vivax*). De esta forma, todas las 90 muestras incluidas en el ensayo AmpliSeq fueron empleadas.

Posterior a la amplificación, los productos de PCR fueron diluidos y mezclados con formamida y el marcador de pares de base GeneScan 500 LIZ (Applied Biosystems). Finalmente, fueron analizados mediante electroforesis capilar en el equipo ABI Prism 3130 por la empresa Psomagen.

Los cromatogramas fueron analizados con el software Microsatellite Analysis (Applied Biosystems). En primer lugar, se realizó el control de calidad del marcador de los pares de base. En caso de ser necesario y que fuera posible, se eligió manualmente los puntos de la curva estándar. Luego, se descargó la lista de picos por muestra del software.

Con esos datos, se realizó un script en R para realizar la selección de alelos verdaderos. Como primer paso, se determinó la altura máxima de los picos obtenidos como background en las muestras blanco de reacción. Ese valor fue usado como umbral y todos los picos con alturas menores a ese valor en las muestras fueron descartados. Posteriormente, se consideró como alelo principal a aquel pico con la mayor altura por microsatélite. Se consideraron como alelos secundarios a aquellos con al menos un tercio del tamaño del alelo principal, y cuyo tamaño en pares de base (pb) no se encuentre a ± 2 bp del tamaño correspondiente al alelo principal. Esta selección de alelos secundarios continuó hasta que no hubo más picos que analizar.

Debido a que es la primera vez que se hace este análisis de forma automatizada, se decidió comprobar manualmente la selección de los alelos por microsatélites. En ese sentido, si el script determinó un pico cuya forma no corresponde a lo esperado en ese

marcador, fue descartado como alelo verdadero. Una vez descartados estos picos, se volvió a clasificar los alelos en principales y secundarios según su altura. Toda muestra con al menos un alelo secundario en cualquier marcador se consideró como policlonal.

6.11 Análisis de genética de poblaciones con MS y comparación con SNP

Para cada muestra, se construyeron los haplotipos haciendo uso de los alelos principales y secundarios. Así, el haplotipo principal fue aquel donde se combinaron los alelos principales de todos los MS. Para las muestras policlonales, el haplotipo secundario fue construido con todos los alelos secundarios en los marcadores que correspondía, y con el alelo principal en los MS donde no se detectó otro alelo. Ello se realizó para simplificar la construcción de haplotipos, descartando la posibilidad de que distintos alelos secundarios puedan pertenecer a diferentes clonas.

Para determinar la inclusión de haplotipos secundarios en los análisis posteriores, se construyeron sets de haplotipos: 1) solo haplotipos principales de muestras monoclonales, 2) haplotipos principales de muestras monoclonales y policlonales, 3) haplotipos principales de muestras monoclonales y policlonales + haplotipos secundarios de muestras policlonales en solo un locus, 4) todos los haplotipos principales y secundarios de todas las muestras. Esta construcción de sets se realizó de dos formas: agregada (cada haplotipo del set anterior es incluido en el siguiente set), y separada (solo haplotipos nuevos fueron incluidos en cada set).

Posteriormente, se calculó la diferenciación genética entre los sets, tanto de forma agregada como separada, calculando el F_{st} con el paquete *hierfstat*. Al realizar esto, los F_{st} fueron cercanos a 0, indicando que no habría diferencia entre los sets y por tanto,

la inclusión de haplotipos secundarios era posible. De esa forma, se utilizaron todos haplotipos principales y secundarios de todas las muestras, tanto para *P. vivax* y *P. falciparum*. Los haplotipos secundarios se consideraron como muestras distintas a la original (se les asignó un nuevo código).

Una vez determinada los haplotipos a usarse, se calculó la H_e como parámetro de diversidad genética, el F_{st} para analizar la diferenciación genética, y se realizaron análisis de PCA y DAPC para investigar la estructuración poblacional. Para ambas especies, estos análisis se realizaron clasificando las muestras por localidad y año. Además, en el caso de *P. falciparum*, también se realizó el análisis de solo las muestras de NJ, considerando cada mes de colección.

Los mismos análisis (H_e , F_{st} , PCA y DAPC) fueron realizados utilizando los *barcodes* de SNP para cada especie. Debido a que el valor máximo de H_e al usar SNPs es 0.5, mientras que usando MS es 1, se comparó los patrones en la diversidad genética entre MS y SNPs, mas no los valores exactos. Para F_{st} , se contrastaron los valores obtenidos en cada comparación de parejas de grupo de muestras. Para el PCA y DAPC, se observó la dispersión de las muestras en clusters.

6.12 Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos se realizaron en R Studio (versión 2022.12.0) utilizando R (versión 4.2.2). Para determinar la normalidad de los datos de las variables cuantitativas, se usó la prueba de Shapiro-Wilk. Para NJ, se calculó la proporción del sexo de los participantes y la mediana y su rango intercuartílico de la edad por cada

tipo de colección (ACD y PCD). Para comparar las proporciones de infecciones detectadas entre los métodos de colección, se utilizó la prueba Z de proporciones. Para comparar la parasitemia de las infecciones por especie, se empleó la prueba U de Mann-Whitney. Para comparar la tasa de positividad entre cada ACD y la proporción de infecciones policlonales entre cada grupo de estudio, se utilizó la prueba de Chi cuadrado. Para comparar la He entre los grupos de análisis, se empleó la prueba Kruskal-Wallis. La significancia estadística fue determinada por un valor de $p < 0.05$ para todas las pruebas estadísticas.

VII. RESULTADOS

7.1 Epidemiología de malaria en Nueva Jerusalén (NJ)

Desde noviembre de 2019 hasta marzo de 2020, se recolectaron 2678 muestras en NJ (Tabla 7). Poco más del 55% de las muestras fue recolectada de mujeres. Además, la mediana de la edad de los participantes fue 12 años. El rango de edad más frecuente correspondió a individuos menores de 15 años (48% – 59%). Considerando ambos tipos de colección (ACD y PCD), se detectaron un total de 744 infecciones por microscopía (LM) y 862 por PCR. Se detectó una alta proporción de infecciones por *P. vivax* (682 por microscopía, 771 por PCR). Además, se detectaron 5 infecciones mixtas por *P. vivax* y *P. falciparum* por PCR, y otras 4 por microscopía.

Durante 2019, la proporción de infecciones detectadas por el PCD fue mayor que en el ACD, por ambos métodos de diagnóstico (23% vs 13,5% por LM, 30% vs 20% por PCR). Además, la proporción de infecciones detectadas por PCD durante 2020 fue mayor que durante 2019, también por ambos métodos de diagnóstico (35% vs 23% por LM, 38% vs 30% por PCR). La parasitemia en las infecciones por *P. falciparum* fue mayor que en las infecciones por *P. vivax* (Mediana: 2294 vs 465 parásitos/ul, $p < 0,05$).

Tabla 7. Características sociodemográficas e infecciones de malaria durante la detección activa (ACD) y pasiva (PCD) de casos en Nueva Jerusalén

	ACD 2019 (n = 616)	PCD 2019 (n = 468)	PCD 2020 (n = 1594)
Sexo			
Masculino	273 (44.3%)	210 (44.9%)	704 (44.2%)
Feminino	343 (55.7%)	258 (55.1%)	890 (55.8%)
Edad			
	12 (5 – 29.5)	16 (5 – 27.25)	13 (5 – 27)
Rango de edad			
0-15	363 (58.9%)	227 (48.5%)	844 (52.9%)
15-25	93 (15.1%)	90 (19.2%)	263 (16.5%)
25-45	116 (18.8%)	110 (23.5%)	384 (24.1%)
>45	44 (7.2%)	41 (8.8%)	103 (6.5%)
<i>Plasmodium</i>			
Microscopía (n, %)	83 (13.5%)	107 (22.9%)	554 (34.8%)
PCR (n, %)	123 (20.0%)	139 (29.7%)	600 (37.6%)
Parasitemia por PCR [par/ul, Me (RIQ)]	55.2 (8.4 – 570)	368 (16.3 – 1616)	777 (95 – 3928)
<i>P. vivax</i>			
Microscopía (n, %)	76 (12.3%)	102 (21.8%)	504 (31.6%)
PCR (n, %)	114 (18.5%)	127 (27.1%)	530 (33.2%)
Parasitemia por PCR [par/ul, Me (RIQ)]	49.5 (7.9 – 410)	383 (17.6 – 1782)	715 (84.9 -3245)
<i>P. falciparum</i>			
Microscopía (n, %)	7 (1.14%)	5 (1.07%)	46 (2.88%)
PCR (n, %)	9 (1.46%)	10 (2.14%)	67 (4.20%)
Parasitemia por PCR [par/ul, Me (RIQ)]	732 (81.5 – 6893)	90 (10.2 – 755)	6794 (267 – 14732)

Me: mediana, RIQ: rango intercuartílico

Al analizar las infecciones durante el PCD (Fig. 3), la mayoría fueron causadas por *P. vivax* (657/739, 88.9%). Durante el estudio, se colectaron muestras en 133 días; en la

mayoría de ellas (96%, 128/133), se detectó al menos una infección por PCR. La mediana del número de infecciones por *P. vivax* por día fue de 4 (IQR: 2 – 6), lo que denota una transmisión persistente de malaria en la comunidad. En cambio, las infecciones por *P. falciparum* aparecieron como clústeres temporales, lo que fue especialmente notorio en febrero y marzo.

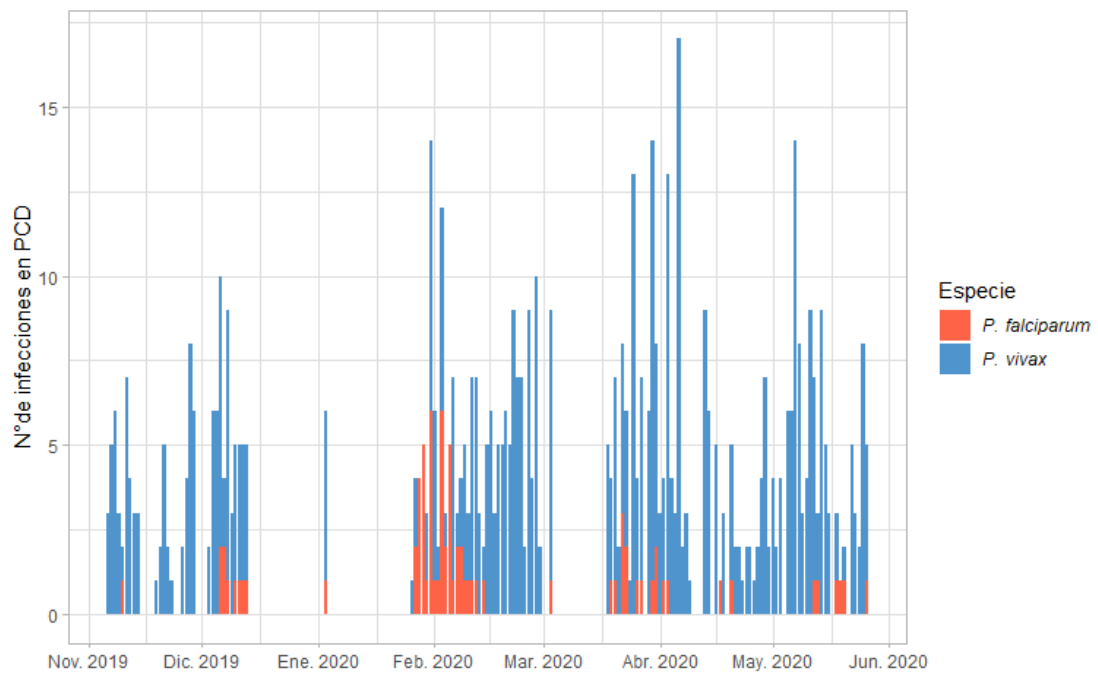


Figura 3. Distribución diaria de infecciones por *P. vivax* y *P. falciparum* durante el PCD en NJ. Las barras representan el número de infecciones PCR positivas en cada día (azul: *P. vivax*, rojo: *P. falciparum*).

7.2 Efecto de la intervención ACD en NJ

Como se mencionó anteriormente, se realizaron 3 visitas de detección activa de casos (ACD) a intervalos de 7 días. Para describir el efecto a corto plazo del ACD en la

reducción de infecciones de malaria en NJ, se calcularon los cambios en la tasa de positividad de malaria por microscopía y PCR durante ese tiempo (Fig. 4).

De los 521 habitantes, la cobertura media en el ACD semanal fue 39,4%. Sin embargo, la cobertura acumulada (la proporción de la población con al menos una muestra recolectada) fue del 93% después de las 3 intervenciones. En total, se detectaron 83 (13,4 %) y 123 (20 %) infecciones de malaria mediante microscopía y PCR, respectivamente. Más del 90% de las infecciones detectadas se debieron a *P. vivax*.

La tasa de positividad en cada ACD varió entre 10 y 15% por microscopía, y 15 a 22% por PCR. El ACD 1 (n = 202) presentó la menor tasa de positividad por microscopía (9,9%) y por PCR (15.3%) en comparación con las demás visitas ACD (ACD 2: n= 206, 14.9 y 22.1 %; ACD 3: n = 208, 15,5 y 22.3%). No hubo una diferencia en la tasa de positividad por LM ($p = 0.189$) o PCR ($p = 0.134$) entre las tres visitas, lo que indica que ACD no logró reducir los casos de malaria en NJ a corto plazo.

Alrededor del 20% de la población (101/521) proporcionó muestras en más de una visita durante el ACD. La mayoría de ellos (67/101, 67%) tuvieron resultados negativos de PCR para todas sus muestras. Por otro lado, 9 individuos tuvieron una muestra positiva por PCR, 1 o 2 semanas después de una muestra negativa por PCR.

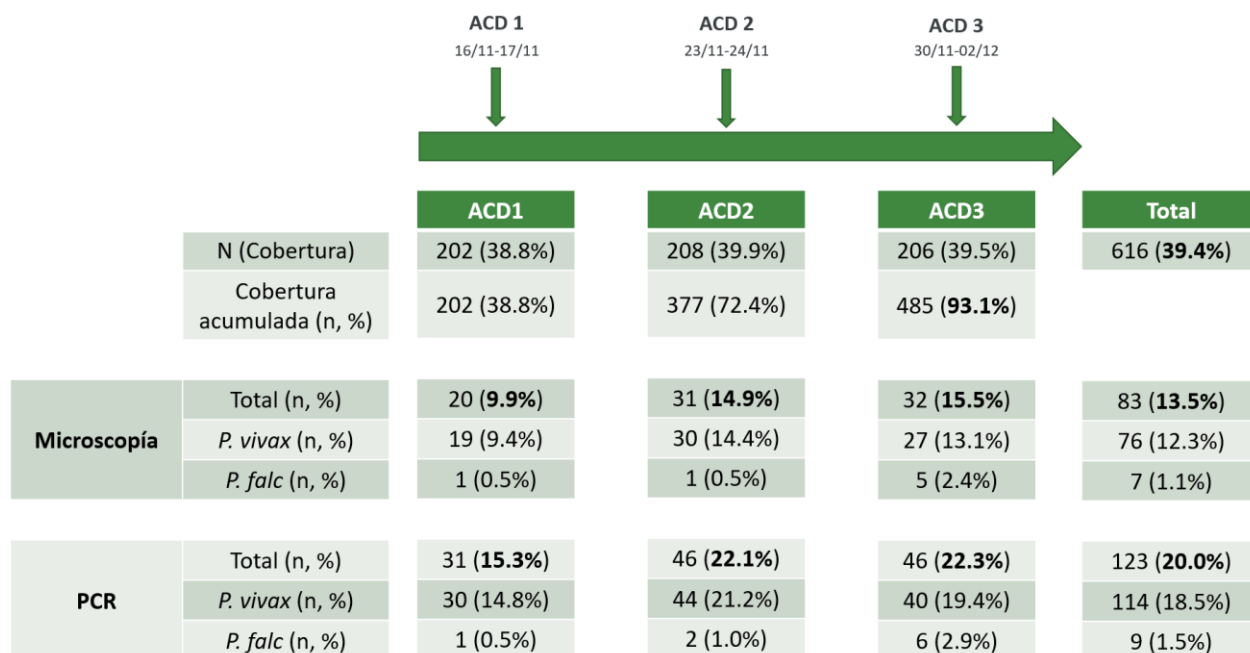


Figura 4. Efecto de la intervención de ACD sobre la malaria en NJ. Se muestra la tasa de positividad en cada visita semanal de ACD, determinada por microscopía o PCR, de las infecciones de malaria segregadas por especie.

7.3 Microepidemiología de *P. vivax* (Pv) en NJ

Para investigar los cambios temporales de la estructura poblacional de Pv en NJ, se analizaron muestras de cada visita de ACD (ACD 2019) y de abril de mayo 2020 (PCD 2020) con el ensayo Pv AmpliSeq Peru (Tabla 6). Se encontró una alta proporción (79 – 92%) de infecciones policlonales por *P. vivax* (Tabla S1), sin diferencias significativas entre los cuatro grupos ($p = 0.83$).

Las muestras de ACD 2019 y PCD 2020 no mostraron agrupamiento en el PCA (Fig. 5A). No hubo diferenciación entre cada visita de ACD (Fig. S1). La diversidad genética

(H_e : 0.35 – 0.38) fue moderada, sin diferencias en el tiempo ($p = 0.94$). En tanto, la diferenciación genética fue baja (F_{st} : 0.01 - 0.10) (Fig. S1).

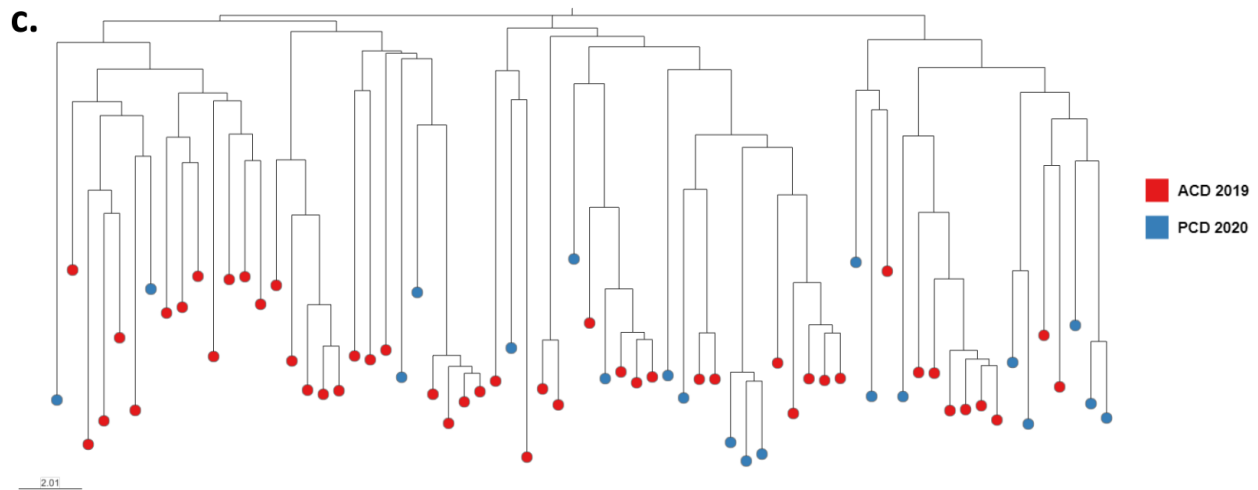
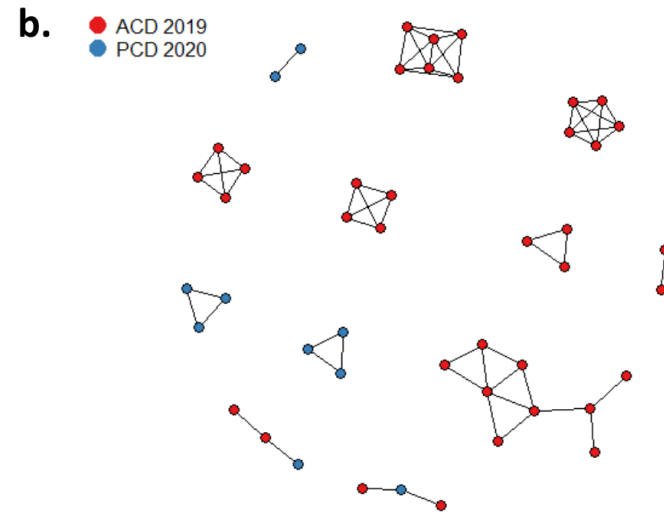
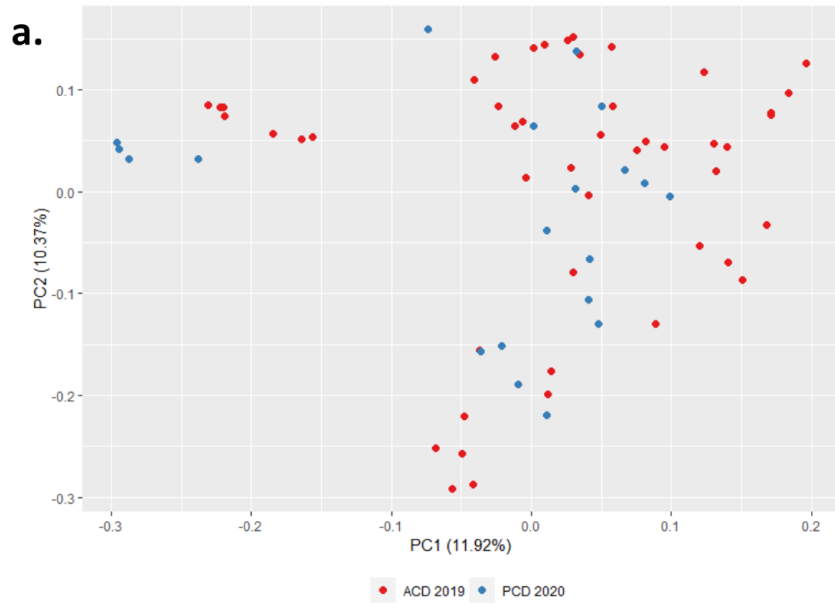


Figura 5. Estructura poblacional y conectividad parasitaria de Pv en NJ. (A) PCA de 68 muestras de Pv en NJ. Los esquemas de color representan el tiempo de colección. (B) Red inferida por identidad por descendencia (IBD) entre muestras de Pv de NJ. Las líneas que conectan pares de parásitos indican que más de 45% de su genoma descenden de un ancestro común. (C) Árbol filogenético creado por el algoritmo de unión de vecinos (*neighbor joining*) con muestras de Pv de NJ. Todos los análisis muestran la ausencia de agrupamiento por tiempo.

Para evaluar la conectividad dentro de la comunidad, se generó una red de conexión entre muestras de Pv que comparten un IBD mayor al 45% (Fig. 5B). La población de Pv en NJ se caracterizó por muchos grupos de muestras genéticamente similares. Sin embargo, ningún clúster fue exclusivo de un tiempo de colección, es decir, algunos clústeres estuvieron presentes todo el tiempo de estudio. Esto representa la presencia de muchos parásitos locales que circulan en NJ. También se observó un patrón similar en el análisis filogenético (Fig. 5C).

7.4 Microepidemiología de *P. falciparum* (Pf) en NJ

Para investigar las diferencias entre los clústeres temporales observadas en la Fig. 3, se analizaron muestras colectadas en las visitas ACD (Nov 2019), diciembre 2019 (Dec 2019), febrero 2020 (Feb 2020), marzo 2020 (Mar 2020) y abril & mayo 2020 (Apr-May 2020) (Tabla 6). Se encontró baja proporción de infecciones policlonales (21% en

2019, 39% en 2020) (Tabla S1). Dicha proporción en Feb 2020 (58.6%) fue significativamente distinta a lo encontrado en los demás meses ($p = 0.00021$).

La PCA mostró que la población de Pf en NJ estaba estructurada en 3 grupos (Fig. 6A). Cerca de la mitad de las muestras del 2019 (6/14, 43%) estuvieron en el Clúster 1, junto con una muestra de febrero y abril/mayo 2020. El Clúster 2 consistió exclusivamente de la mayoría de las muestras Feb 2020 (23/29, 79.3%). Finalmente, casi todas las muestras de marzo 2020 (8/9, 88.9%) estaban en el Clúster 3, que también tenía algunas muestras de otros meses (febrero a mayo 2020). El Clúster 2 se diferenció claramente de los otros dos clústeres de la comunidad. Al explorar la conectividad dentro de NJ, los 3 grupos se observaron nuevamente tanto en la red IBD (Fig. 6B) como en el árbol filogenético (Fig. 6C); así como en el análisis DAPC (Fig. S2).

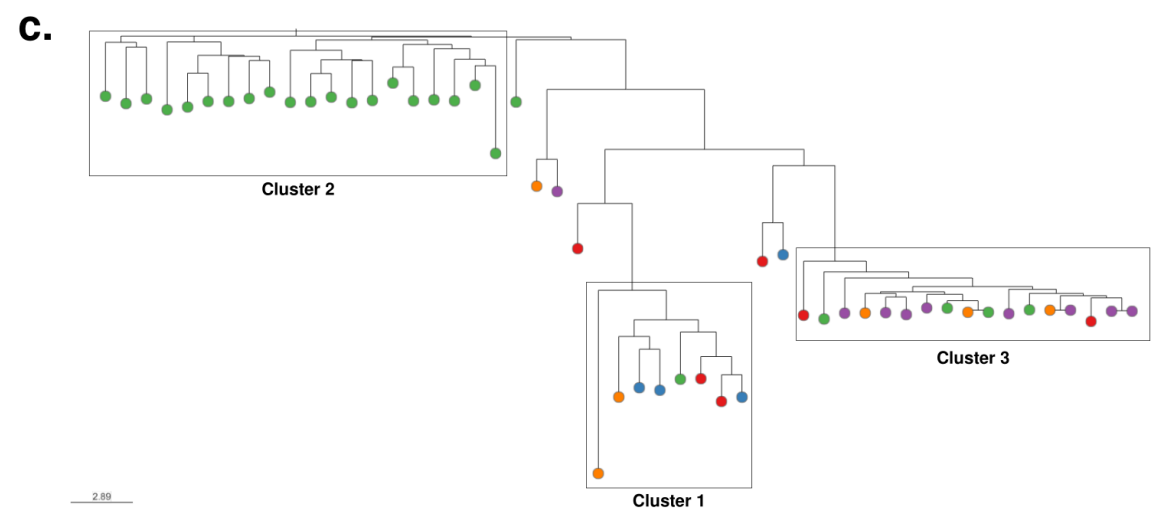
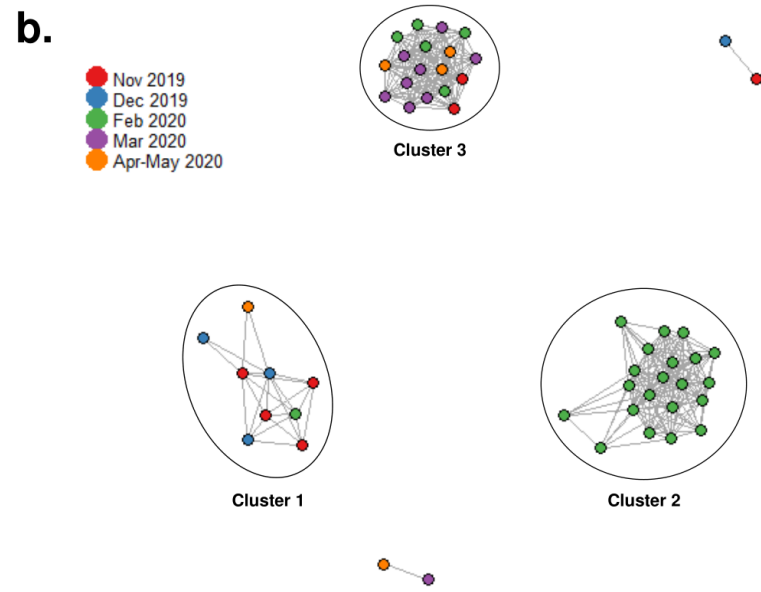
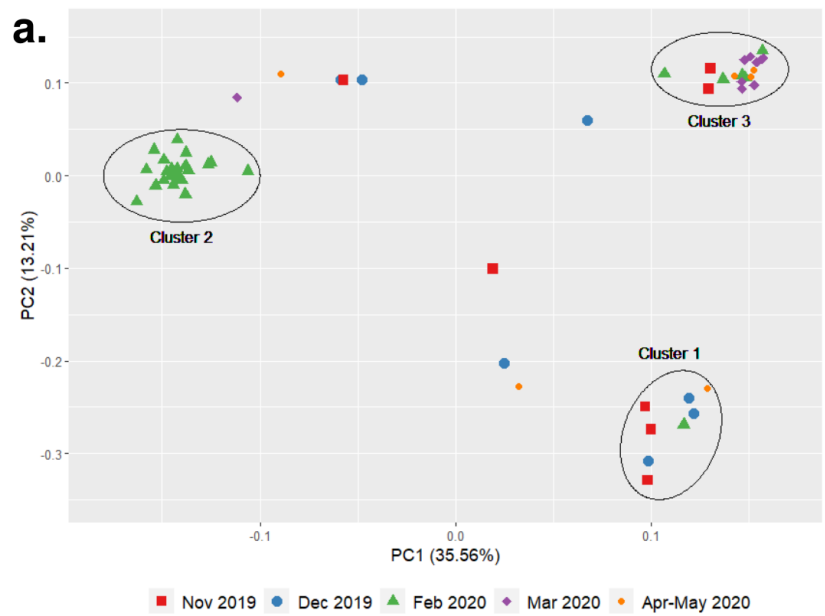


Figura 6. Estructura poblacional y conectividad parasitaria de Pf en NJ. (A) PCA de 58 muestras de Pf en NJ. Los esquemas de forma/color representan el tiempo de colección. (B) Red inferida por identidad por descendencia (IBD) entre muestras de Pv de NJ. Las líneas que conectan pares de parásitos indican que más de 45% de su genoma descienden de un ancestro común. (C) Árbol filogenético creado por el algoritmo de unión de vecinos (*neighbor joining*) con muestras de Pf de NJ. Todos los análisis muestran una subestructuración de 3 clústeres, donde resalta el Clúster 2 solo con muestras de febrero 2020.

La diversidad genética en la población de Pf en NJ fue muy baja (H_e : 0 – 0.38). Las muestras de febrero 2020 fueron más diversas que las de marzo 2020 ($p = 0.002$) (Fig. S2). Además, no se observó diferenciación genética entre las muestras de 2019 ($F_{st} = 0$). Por el contrario, las muestras de febrero ($F_{st} = 0.3 – 0.51$) y marzo 2020 ($F_{st}: 0.27 – 0.51$) fueron las más diferenciadas (Fig. S2).

7.5 Comparación entre NJ y otras áreas remotas

Para Pv, las muestras de NJ fueron comparadas con otras de áreas remotas: Mazán y Yavari (Fig. 7). Las muestras de Yavari formaron un clúster separado a NJ y Mazán en el PCA (Fig. 7A). Los SNPs críticos que contribuyeron más a dicha diferenciación se muestran en la Tabla S2. Además, las muestras de NJ tuvieron una diversidad similar a Mazán ($H_e = 0.35$), mientras que las de Yavari tuvieron una baja diversidad ($H_e = 0.01$) (Fig. 7B). Sin importar el tiempo de colección, las muestras de NJ tuvieron poca diferenciación con Mazán ($F_{st}: 0.07 – 0.11$), pero tuvieron alta diferenciación con

Yavari (F_{st} : 0.43 – 0.52) (Fig. 7C). La red de IBD mostró un patrón similar al PCA y confirmó que la población de Pv en Yavari fue clonal (Fig. 7D).

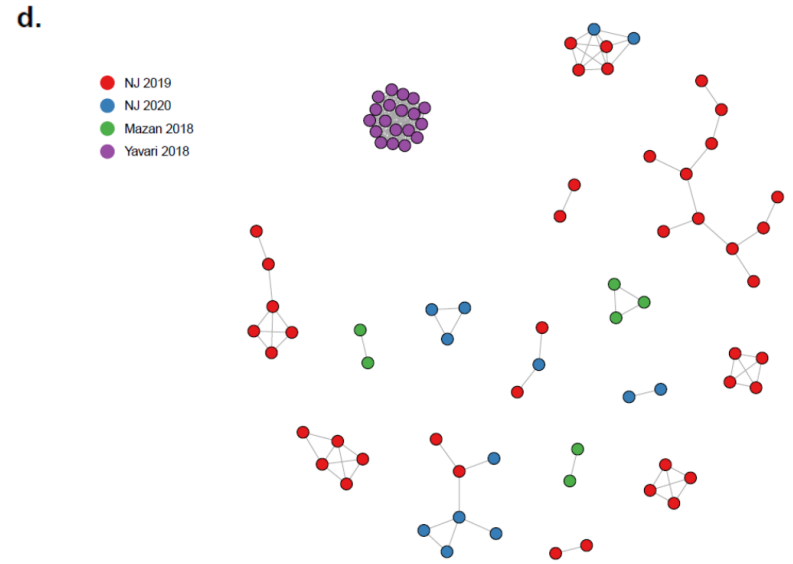
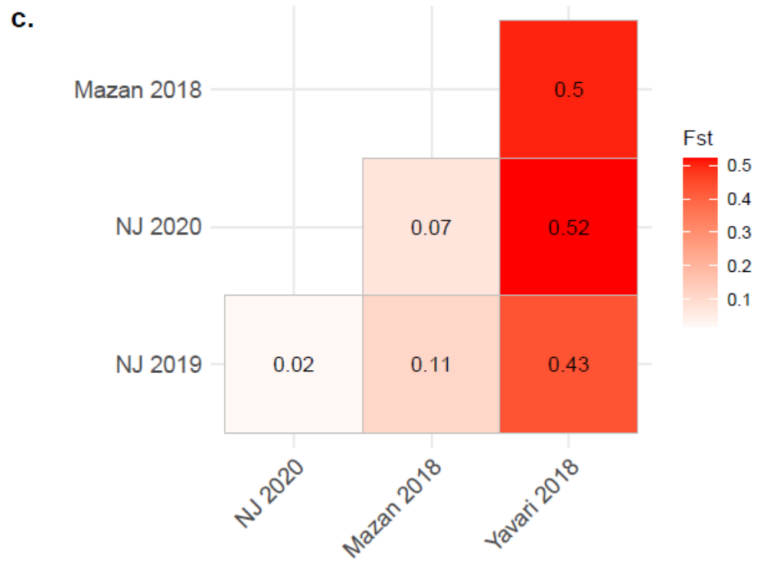
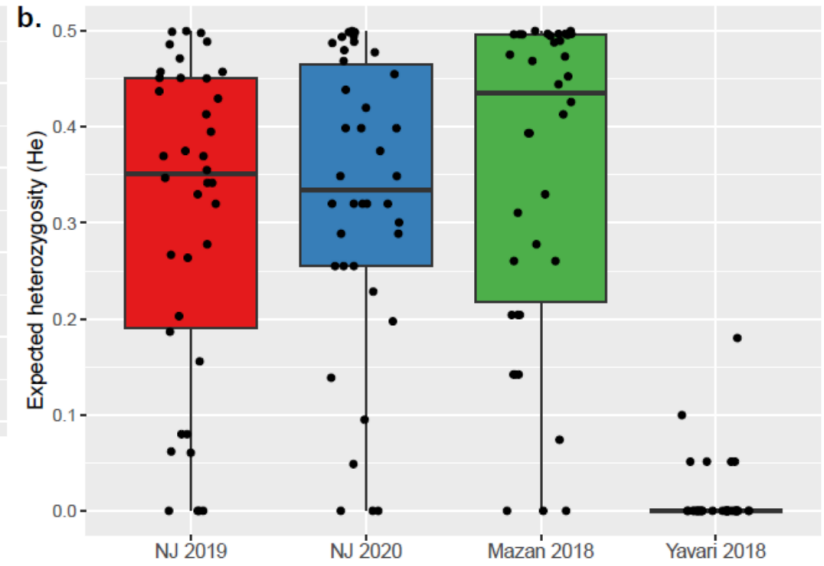
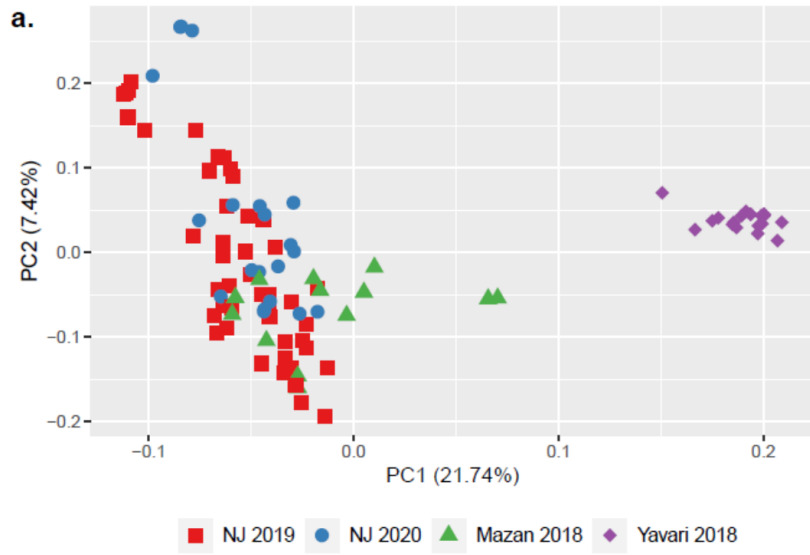


Figura 7. Genética de poblaciones y conectividad de muestras de Pv de NJ y otras áreas remotas. (A) PCA de las muestras de Pv: NJ (n = 58), Mazán (n = 12) y Yavarí (n = 21). Los esquemas de forma/color representan a cada área/año de recolección. (B) Heterocigosidad esperada (He). Cada punto representa el He promedio de 38/41 SNPs no fijados del *barcode* para todas las muestras de cada grupo respectivo. (C) Estadístico Fst por pares entre los grupos. El esquema de colores del mapa de calor se basó en los valores máximo y mínimo de Fst. (D) Red inferida por identidad por descendencia (IBD) de muestras de Pv de NJ. Las líneas que conectan pares de parásitos indican que >90% de sus genomas descienden de un ancestro común. Las muestras de NJ y Mazán fueron similares, pero distintas a Yavarí, que presentó una población clonal, altamente diferenciada y con baja diversidad.

También, se comparó las muestras de Pf de NJ con otras de Mazán, Santa Emilia y Andoas (Fig. 8). Hubo muestras de NJ que se agruparon por separado con algunas muestras de Andoas y Santa Emilia en el PCA (Fig. 8A). Los SNPs críticos que contribuyeron más a dichos agrupamientos se muestran en la Tabla S3. Además, las muestras de Mazán ($He = 0$) fueron menos diversos que los parásitos de NJ y de las otras áreas ($He: 0 - 0.47$, $p = 0.0002$) (Fig. 8B). NJ, Santa Emilia y Andoas presentaron una moderada diferenciación genética entre ellos ($Fst: 0.42 - 0.58$) (Fig. 8C). La red de IBD (Fig. 8D) mostró patrones de conectividad similares al PCA (Fig. 8A). Notablemente, las muestras de febrero 2020 tuvieron cierto grado de conectividad con dos muestras de Andoas (Fig. S3).

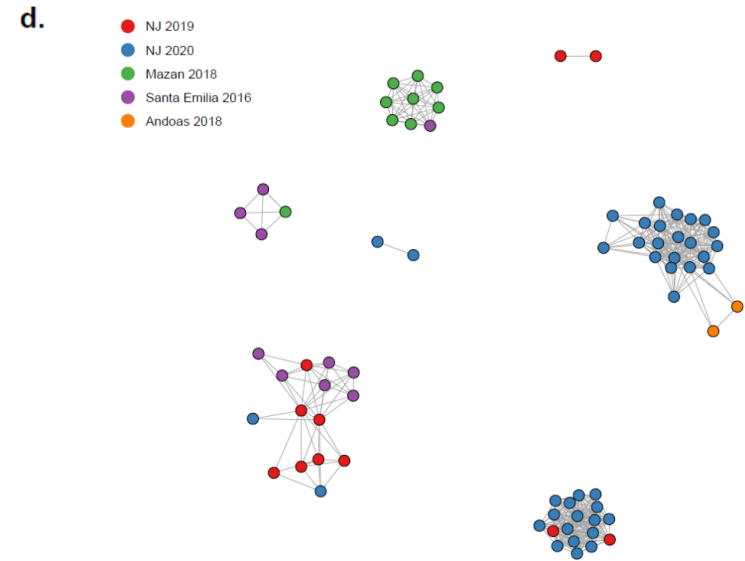
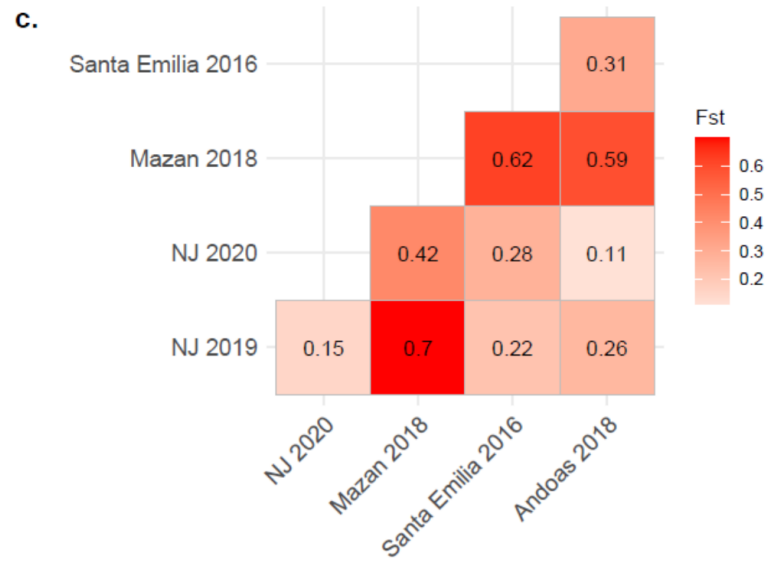
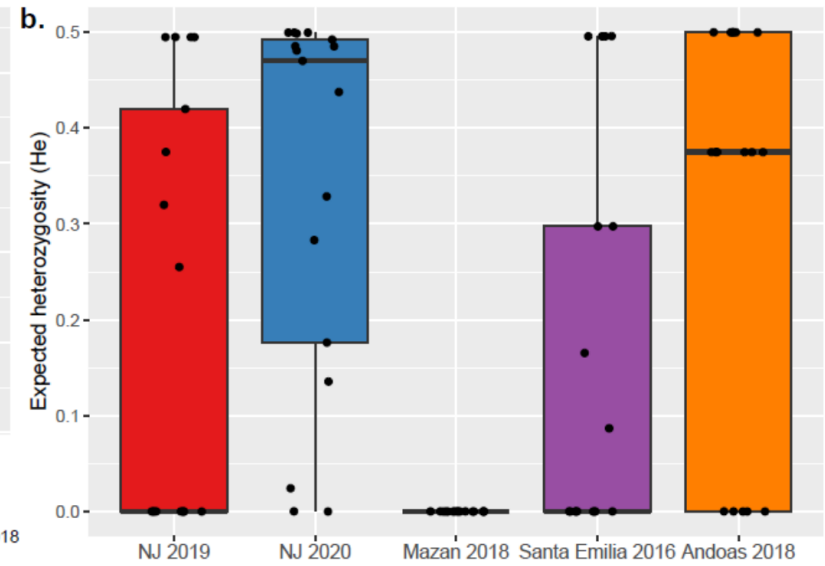
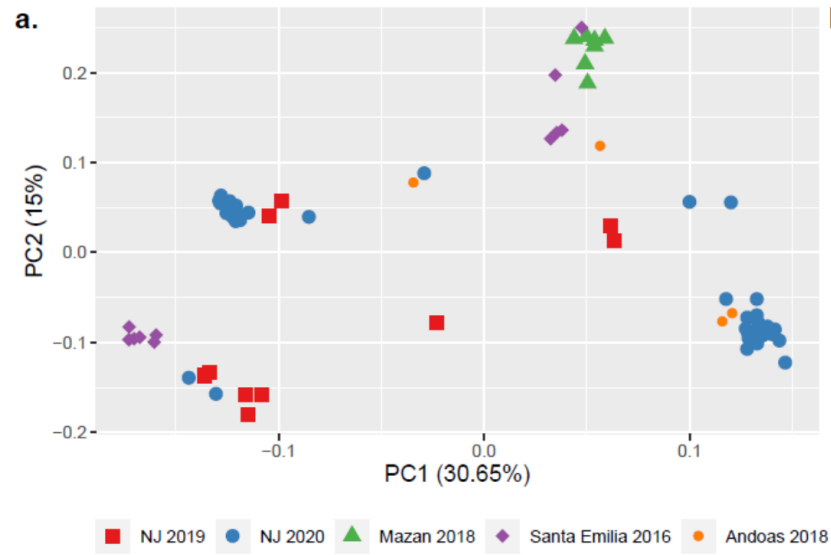


Figura 8. Genética de poblaciones y conectividad de muestras de Pf de NJ y otras áreas remotas. (A) PCA de las muestras de Pf: NJ (n = 58), Mazán (n = 9), Santa Emilia (n = 12) y Andoas (n = 4). Los esquemas de forma/color representan a cada área/año de recolección. (B) Heterocigosidad esperada (He). Cada punto representa el He promedio de 17/28 SNPs no fijados del *barcode* para todas las muestras de cada grupo respectivo. (C) Estadístico Fst por pares entre los grupos. El esquema de colores del mapa de calor se basó en los valores máximo y mínimo de Fst. (D) Red inferida por identidad por descendencia (IBD) de muestras de Pf de NJ. Las líneas que conectan pares de parásitos indican que >45% de sus genomas descienden de un ancestro común. Las muestras de NJ tuvieron relación con las muestras de Andoas, Santa Emilia y Mazán. Este último lugar tuvo la menor diversidad y alta diferenciación.

7.6 Marcadores moleculares de resistencia

Para Pf, se genotificaron genes validados asociados con la resistencia a diferentes antimaláricos en NJ y otras áreas remotas de la Amazonía peruana (Tablas S4 & S5). Para *pfldhfr* (resistencia a la pirimetamina), el haplotipo con triple mutación RICNI fue el más común en NJ (67%). En particular, el 59 % de las muestras de NJ en febrero 2020 tenían un haplotipo mixto (infección policlonal). En las demás zonas sólo se encontró el haplotipo RICNI. Para *pfldhps* (resistencia a sulfadoxina), observamos muestras con haplotipos de tipo silvestre o *wild-type* (SAKKA, 31%), con triple mutación (SGEGA, 34,5%) y mixto (28%) durante el período de estudio en NJ. En comparación con diciembre de 2019, la proporción de haplotipos SAKAA (14% a 41%) y mixtos (29 a 41%) aumentó en febrero de 2020. El haplotipo SGEGA volvió a ser el más predominante desde marzo de 2020 (67%).

En otras áreas, el haplotipo SGEGA fue el más frecuente (50 – 92%). Cabe destacar que el haplotipo de tipo silvestre también se encontró en Andoas (n = 2, 50%).

El haplotipo con triple mutación NDFCDY en *pfmdr1* (resistencia a CQ y MQ) fue el más común en NJ (90%) y otras áreas remotas (78 – 100%). De manera similar, el haplotipo SVMNT en *pfcr1* fue el predominante en NJ (57%) y el resto de áreas (67 – 100%). Sin embargo, este gen no pudo amplificarse mediante el ensayo AmpliSeq en el 43 % de las muestras de NJ y en el 16 % de las muestras de otros sitios.

No se encontraron mutaciones validadas para la resistencia a la artemisinina en *pfk13* (C580Y, I543T, R539T) en ninguna muestra. La mutación K189T (fuera de la región de la hélice) se encontró en el 83% de las muestras de NJ de febrero de 2020, aunque las muestras de tipo silvestre en esta posición fueron las más frecuentes en el resto de los meses (57 – 89%). Esta mutación también fue más frecuente en Mazan (90%) y Andoas (100%), mientras que en Santa Emilia, las muestras de tipo silvestre fueron comunes (75%).

Asimismo, en este trabajo no se encontraron mutaciones en coronina (G50E, R100K, E107V) asociadas a resistencia a la artemisinina. También se genotiparon mutaciones previamente reportadas en Perú, V62M y V424I (Kattenberg et al., 2023). En NJ, se encontraron muestras de haplotipos mixtos (que incluyen V62M) solo en febrero de 2020 (41 %); mientras que las muestras de tipo silvestre predominaron en el resto del período de estudio (86 – 100%). La mutación V424I fue más común desde marzo de 2020 (83 – 100%), mientras que las muestras de tipo silvestre predominaron notablemente en febrero de 2020 (83%). En otras áreas, las muestras de Mazan tenían predominantemente V424I (89%), pero el resto de

los lugares informaron principalmente muestras de tipo silvestre para las posiciones 62 (100%) y 424 (75 – 92%).

También se encontraron haplotipos reportados previamente en el gen *ubp1*, no asociados a resistencia (Kattenberg et al., 2023). En NJ, la variante R1133S + E1011K fue la más predominante (43 – 89%); excepto en febrero de 2020, cuando la variante Q107L y/o K1193T fue la más común (79%). En el resto de zonas, el haplotipo con cuádruple mutación (R1133S + E1011K + K764N + K774N) estuvo presente en Mazán, Santa Emilia y Andoas (33 – 89%).

Para Pv, se exploró mutaciones en los genes *pvdhfr*, *pvdhps*, *pvm-dr1* y *pvcrt* (Tabla S6). El haplotipo FRTS de *pvdhfr* fue el más predominante en NJ (85% en 2019, 70% en 2020) y Mazan (46%), mientras que FKTS fue el único haplotipo observado en Yavarí (70 % de las muestras). Para *pvdhps*, ninguna muestra tuvo la mutación A553G. Por el contrario, la mutación A338G estuvo presente en todas las áreas (33 – 54%), excepto en Yavarí. Al igual que *pvdhfr*, el haplotipo LMYFF fue el más común en NJ (77% en 2019, 90% en 2020) y Mazan (69%). Sin embargo, todas las muestras de Yavarí tenían el haplotipo MMYFF, que también estaba presente en Mazan (15%). Finalmente, en *pvcrt*, se detectó solo 1 muestra en NJ con una variante intrónica (357+83G>A).

7.7 Genotipificación de *pfhrp2/3*

La presencia o ausencia de los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* en muestras de *P. falciparum* (n = 83) se determinó mediante PCR convencional y el algoritmo basado en el ensayo Pf AmpliSeq (Kattenberg et al., 2023). Se encontraron resultados contrastantes entre ambos métodos (Tabla 8). Según el ensayo AmpliSeq, la delección de *pfhrp2* fue frecuente en todas las áreas (25 – 90%), aunque se encontró

una alta proporción de muestras con resultado inconcluso (30 – 75%), excepto en Mazán. Solo una muestra de NJ tenía el gen según este método (Tabla 8). Por el contrario, usando PCR, la proporción de muestras con el gen *pfhrp2* que se encontró en todas las áreas fue de moderada a alta (50 – 73%), excepto en Mazán, donde todas las muestras tenían delección de dicho gen (Tabla 8).

Además, la presencia del gen *pfhrp3* fue predominante en todas las áreas según el ensayo AmpliSeq (75 - 98%), excepto en Mazán, donde la delección fue predominante (67%). Sin embargo, la proporción de muestras con delección de *pfhrp3* por PCR varió entre 18 y 57% en NJ y Andoas. Todas las muestras de Mazan tenían la delección, mientras que el gen estaba presente en todas las muestras de Santa Emilia (Tabla 8).

Tabla 8. Proporción de presencia o delección de los genes *pfhrp2/3* por PCR y el ensayo AmpliSeq.

	NJ 2019	NJ 2020	Mazán 2018	Santa Emilia 2016	Andoas 2018	Total
	(n = 14)	(n = 44)	(n = 9)	(n = 12)	(n = 4)	(n = 83)
<i>pfhrp2</i> - AmpliSeq						
Delección	6 (48.9%)	31 (70.5%)	8 (88.9%)	5 (41.7%)	1 (25%)	51 (61.4%)
Presencia	1 (7.1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1.2%)
Inconcluso	7 (50%)	13 (29.5%)	1 (11.1%)	7 (58.3%)	3 (75%)	31 (37.3%)
<i>pfhrp2</i> - PCR						
Delección	7 (50%)	22 (50%)	9 (100%)	2 (16.7%)	1 (25%)	41 (49.6%)
Presencia	7 (50%)	22 (50%)	0 (0%)	10 (83.3%)	3 (75%)	42 (50.4%)
<i>pfhrp3</i> - AmpliSeq						
Delección	2 (14.3%)	1 (2.3%)	6 (66.7%)	1 (8.3%)	1 (25%)	11 (13.2%)
Presencia	11 (78.6%)	43 (97.7%)	0 (0%)	11 (91.7%)	3 (75%)	68 (81.9%)
Inconcluso	1 (7.1%)	0 (0%)	3 (33.3%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (4.8%)
<i>pfhrp3</i> - PCR						
Delección	8 (57.1%)	8 (18.2%)	9 (100%)	0 (0%)	2 (50%)	27 (32.5%)
Presencia	6 (42.9%)	36 (81.8%)	0 (0%)	12 (100%)	2 (50%)	56 (67.5%)

La mayoría de las muestras indeterminadas para *pfhrp2* (24/31, 77%) y cerca de un tercio de las muestras con la delección según el ensayo AmpliSeq tuvieron resultados positivos a la presencia del gen *pfhrp2* según la PCR. También, más de la mitad de las muestras con el gen *pfhrp3* (13/18, 54%) y todas las muestras con resultado inconcluso para este gen según el ensayo AmpliSeq tuvieron la delección del gen por PCR (Tabla S7).

Debido a que la PCR ha sido utilizada ampliamente como estándar de oro para la genotipificación de *pfhrp2/3*, se decidió tomar estos resultados para los genotipos finales (Fig. 9). Con la PCR, las muestras *pfhrp2+* / *pfhrp3+* fueron predominantes en Santa Emilia (83%), Andoas (50%) y NJ en 2020 (48%). Sin embargo, la doble delección fue predominante en Mazán (100%) y NJ en 2019 (49%). Dentro de NJ, la proporción de muestras *pfhrp2+* / *pfhrp3+* aumentó en febrero de 2020 (66%) frente a 2019 (36%). De marzo a mayo de 2020, *pfhrp2-* / *pfhrp3+* fue el genotipo predominante (89% en marzo, 67% en abril - mayo).

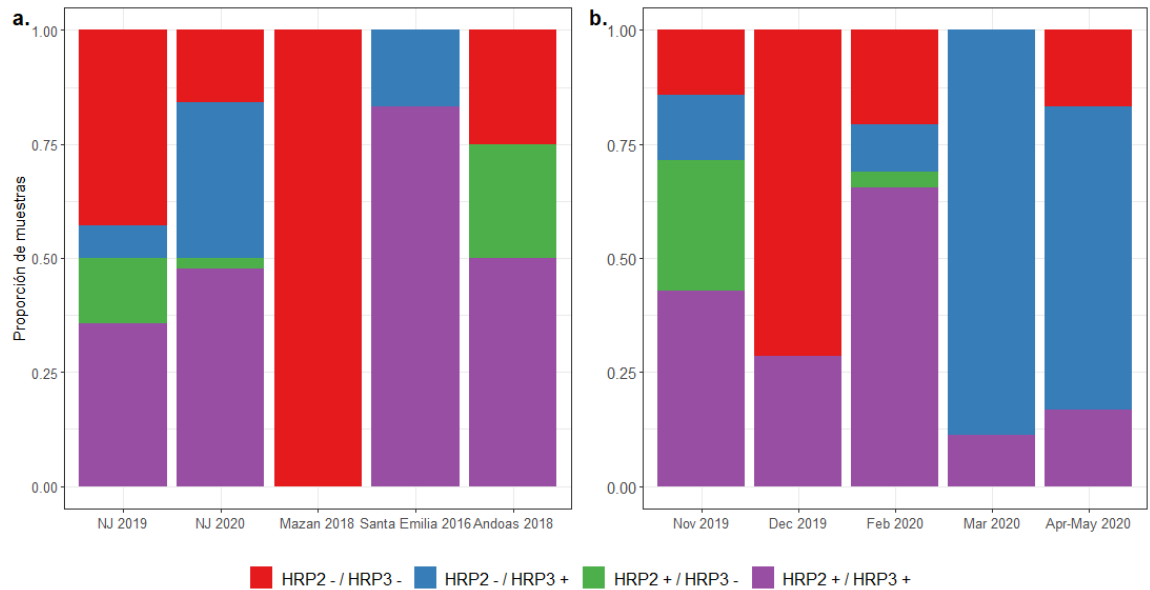


Figura 9. Genotipificación de los genes *pfhrp2* y *pfhrp3*. Los resultados de PCR se consideraron para crear los genotipos HRP2/3 en todas las áreas (A) o dentro de NJ (B). La doble deleción fue predominante en Mazán, pero ambos genes estuvieron presentes en el resto de áreas. En NJ, la doble deleción, *pfhrp2+* / *pfhrp3+* y *pfhrp2-* / *pfhrp3+* fueron el genotipo más común en 2019, febrero de 2020 y de marzo a mayo de 2020, respectivamente.

7.8 Clústeres de *P. falciparum* en NJ

Al comparar los 3 clústeres de la población de Pf en NJ (Fig. 6), se observó que el Clúster 3 tuvo la menor diversidad ($H_e = 0$, $p = 0.004$) y una alta diferenciación ($F_{st}: 0.83 - 0.85$) comparado con los otros 2 clústeres (Fig. S4). La información sobre marcadores de resistencia y los genotipos de *pfhrp2/3* de clústeres se muestran en la Fig. 10; y también pueden ser visualizados en <https://microreact.org/project/12yFgakVcYwNT1JjFC8H1K-nj-pf-clusters>. El Clúster 3 mostró haplotipos diferentes a los demás en *pfdhps* (SGEGA), *coronin*

(V424I), *pfk13* (K189T) y *pfhrp2/3* (HRP2 - / HRP3 +). Por el contrario, sólo el Clúster 2 presentó el haplotipo “Q107L y/o K1193T” en *upb1* y la mutación V62M, principalmente como haplotipo mixto, en *coronin*. Finalmente, el Grupo 1 tenía haplotipos similares a los del Grupo 2 o 3 dependiendo de la variante de interés.

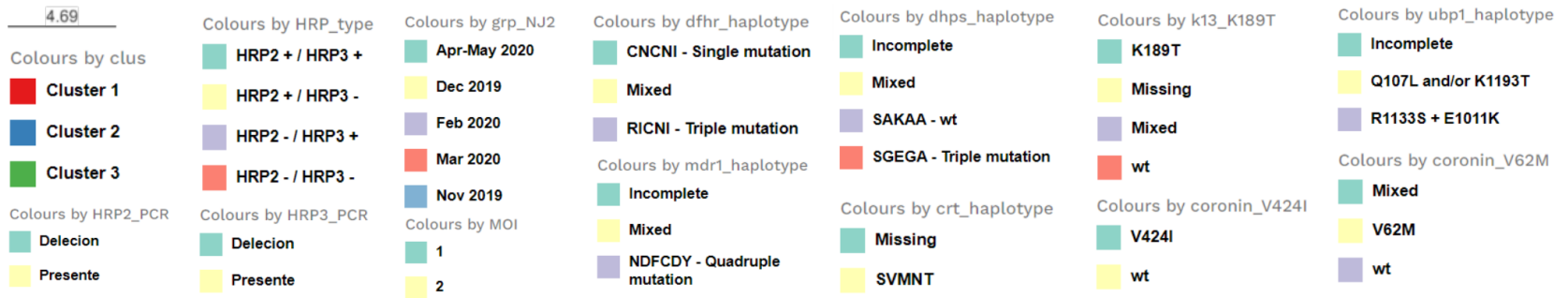
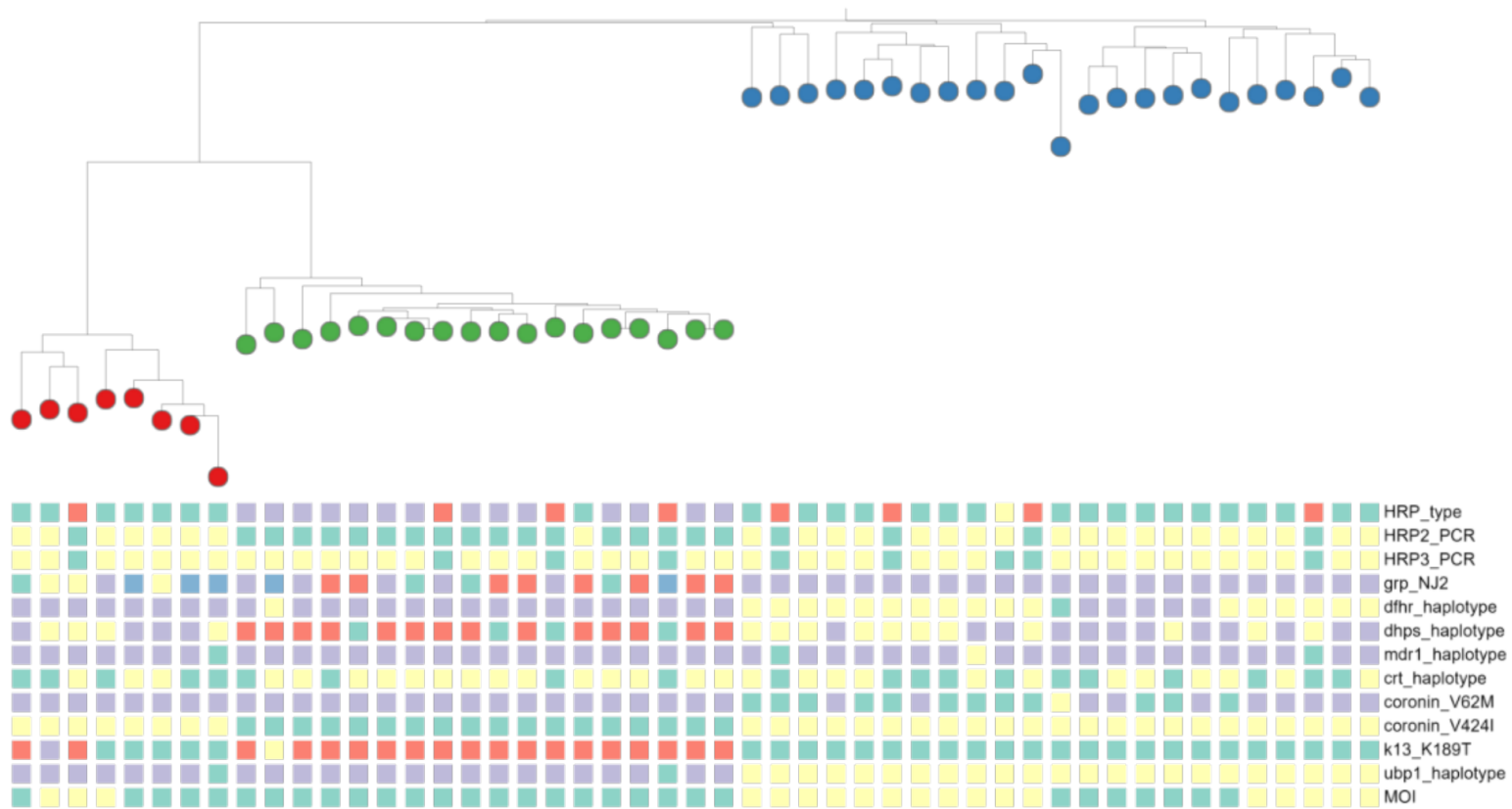


Figura 10. Características de los clústeres de *P. falciparum* en NJ. Árbol filogenético creado por el algoritmo de unión de vecinos (*neighbor joining*) con muestras de Pf de NJ pertenecientes a los clústeres encontrados en la Fig. 6. Se muestran los resultados de la genotipificación de *pfhrp2/3*, los haplotipos y mutaciones de los marcadores de resistencia (*dfhr*, *dhps*, *crt*, *mdr1*, *k13*, *coronin*, *ubp1*) y la complejidad de infección (MOI).

7.9 Genotipificación por microsatélites (MS) y comparación con el ensayo AmpliSeq

En ambas especies, la genotipificación por microsatélites (MS) tuvo buena eficiencia de amplificación (Fig. S5). En el caso de *P. vivax*, el porcentaje de data faltante promedio de los 16 MS fue 12.8%. Solo 4 MS tuvieron una eficiencia de amplificación menor al 80%. De estos, el marcador Ch14.3010 tuvo el menor desempeño (43.6% de data faltante). Debido a ese motivo, el marcador fue descartado para futuros análisis. En tanto, para *P. falciparum*, el porcentaje de data faltante promedio de los 7 MS fue 3.2%. El marcador TA1 tuvo la peor eficiencia (9.6% de data faltante). A pesar de ello, ningún marcador fue excluido posteriormente.

Posteriormente, se evaluó la inclusión de los haplotipos secundarios y las muestras policlonales. Para ello, se determinó la diferenciación genética (con el F_{st}) de diferentes sets según se explicó en la sección 5.10. Para el caso de *P. vivax*, la diferenciación entre los grupos fue baja (F_{st} : 0 – 0.05), tanto para los sets agrupados como separados (Fig. S6). En tanto, para el caso de *P. falciparum*, hubo un bajo nivel de diferenciación entre los sets agrupados (F_{st} : 0 – 0.04); mientras que, para los sets separados, solo el grupo de muestras monoclonales fue el más distinto (F_{st} :

0.19 – 0.24) (Fig. S6). Debido a que no se observó diferencias entre los sets agrupados para ambas especies, se decidió incluir todos los haplotipos (monoclonales, policlonales principales y secundarios) para los siguientes análisis. En primer lugar, se calculó la diversidad y diferenciación genética de *P. vivax* usando microsatélites (15 MS) y el *barcode* del ensayo AmpliSeq (40 SNPs) (Fig. 11). Para la diversidad, la tendencia en orden de magnitud fue similar entre MS y SNPs (Fig. 11A-B). Similar patrón de resultados se observó con la diferenciación genética (Fig. 11C-D).

Luego, se analizó la estructura poblacional de *P. vivax* con el PCA, usando MS y el *barcode* SNPs. No se obtuvo algún patrón de agrupamiento con ningún tipo de marcador molecular, dado que muestras de distintos grupos estuvieron dispersos entre sí (Fig. 11D-E). En resumen, los MS y los SNPs brindaron resultados similares en cuanto a la estructura poblacional, la diversidad y diferenciación genética para *P. vivax*.

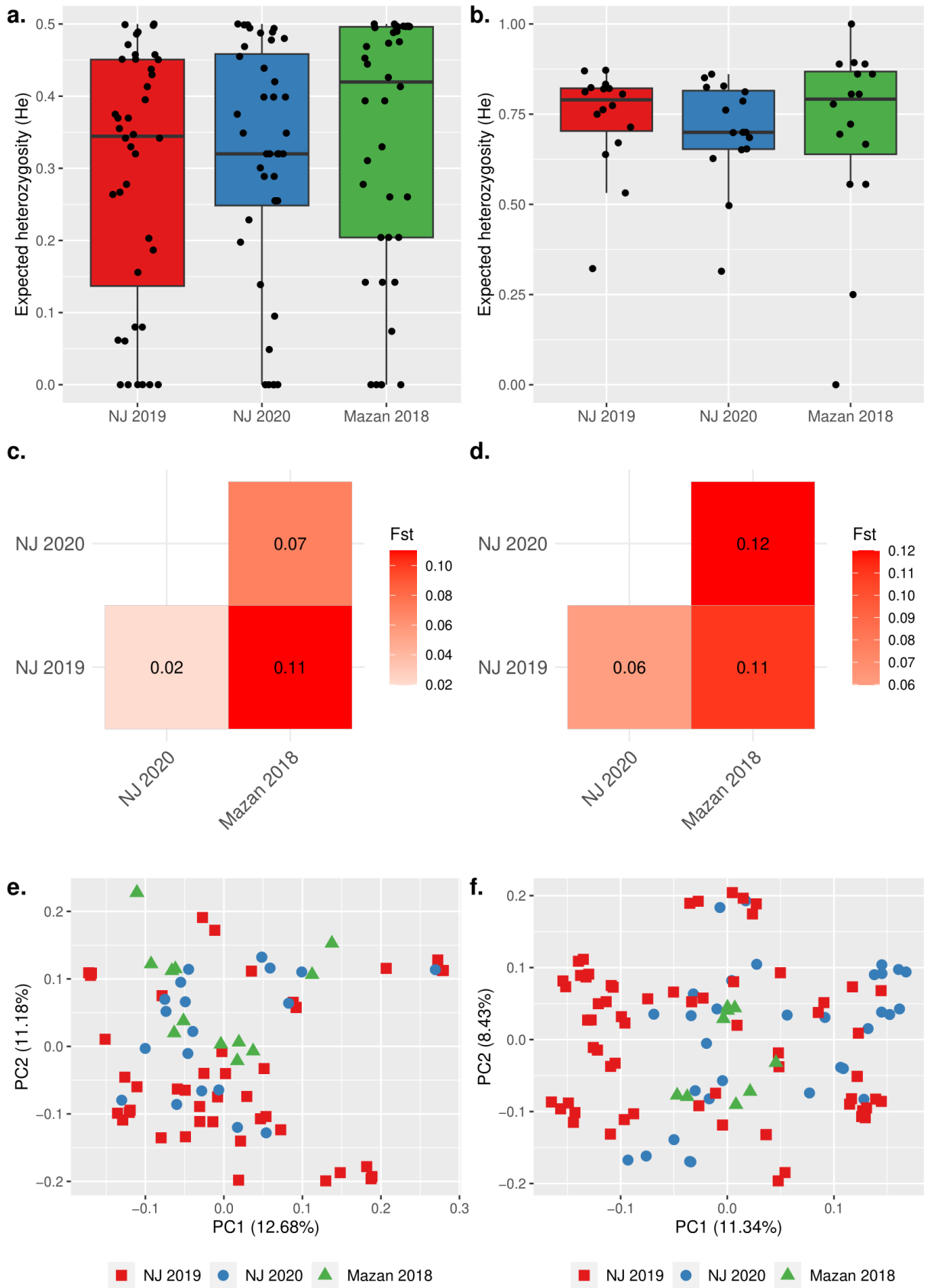


Figura 11. Comparación de la resolución genética entre el *barcode* de SNPs del ensayo AmpliSeq y microsatélites (MS) para *P. vivax*. (A y B) Heterocigosidad esperada (H_e). Cada punto representa el H_e promedio de cada uno de los MS o SNPs del *barcode* para todas las muestras del grupo correspondiente. (C y D) Estadístico F_{st} por pares entre los grupos. El esquema de colores del mapa de calor se basó en los valores máximo y mínimo de F_{st} . (D y E) PCA de 62 muestras de *P. vivax*. Los tres análisis se realizaron con el *barcode* de SNPs del ensayo AmpliSeq (A, C, E) o con MS (B, D, F). Los patrones observados fueron similares entre MS y SNPs en todos los parámetros.

De manera similar, se calculó la diversidad y diferenciación genética de *P. falciparum* usando microsatélites (7 MS) y el *barcode* de SNP del ensayo AmpliSeq (28 SNPs) (Fig. 12). En primer lugar, se notó que 11/28 (39.3%) SNPs estuvieron fijados en todas las muestras, por lo que fueron descartados. En cuanto a la diversidad, Mazán mostró un muy bajo nivel de diversidad ($H_e = 0$) con los SNPs y los MS (Fig. 12A-B). Sin embargo, hubo diferencias en el patrón de diversidad con las demás áreas. Por otro lado, la mayoría de las comparaciones entre áreas tuvieron patrones de diferenciación similar usando MS o SNPs, aunque hubo algunas diferencias cuando Andoas fue comparado con Santa Emilia o NJ 2019 (Fig. 12C-D).

Al analizar la estructura poblacional de *P. falciparum* con el PCA, usando MS y SNPs, se notaron diferencias en los patrones de los clústeres. Con los SNPs, se pudo notar claramente un clúster compuesto por muchas muestras de NJ en 2020 y dos

muestras de Andoas. Al usar MS, estas muestras estuvieron más dispersas (Fig. 12D-E).

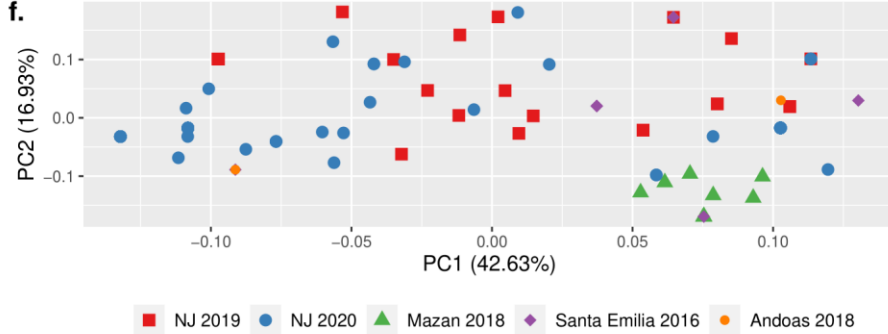
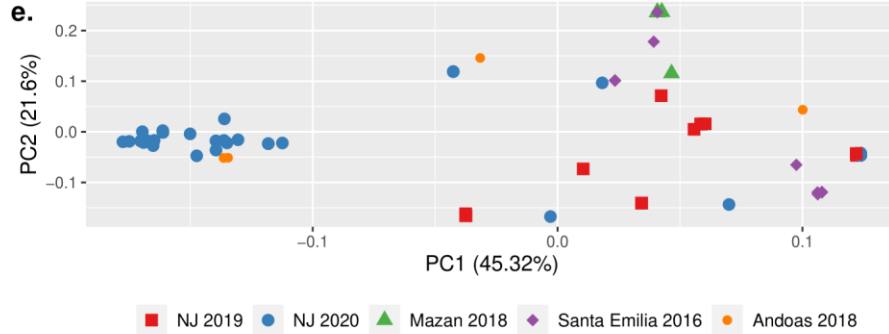
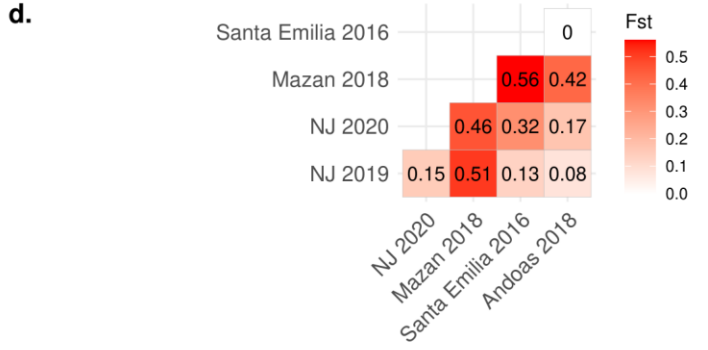
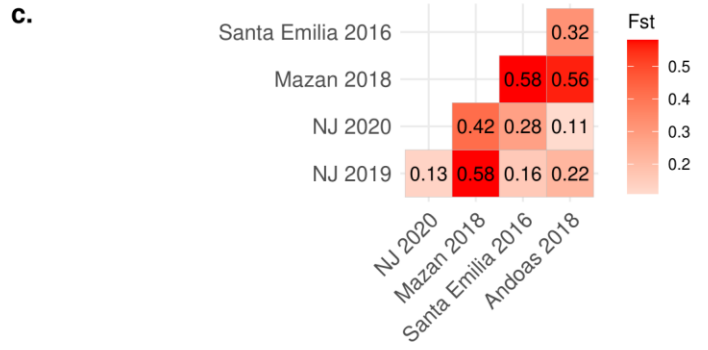
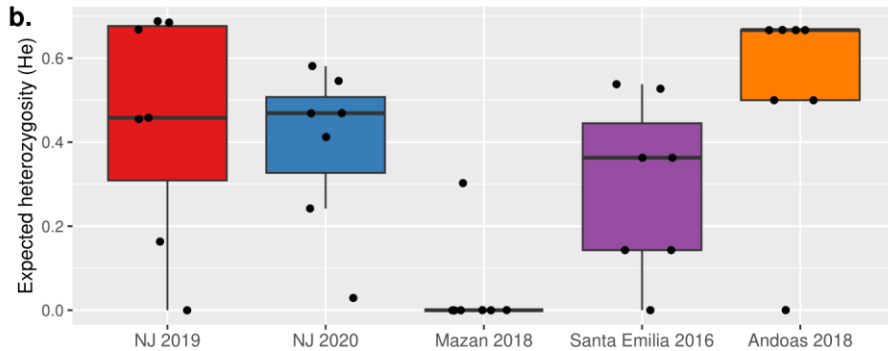
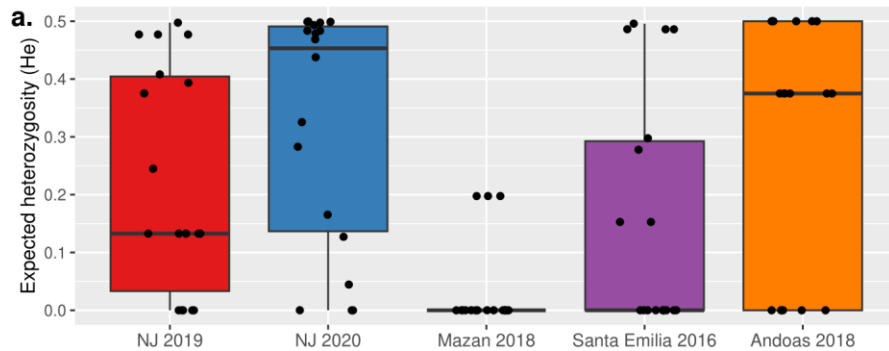


Figura 12. Comparación de la resolución genética entre el *barcode* de SNPs del ensayo AmpliSeq y microsatélites (MS) para *P. falciparum*. (A y B) Heterocigosidad esperada (H_e). Cada punto representa el H_e promedio de cada uno de los MS o SNPs del *barcode* para todas las muestras del grupo correspondiente. (C y D) Estadístico F_{st} por pares entre los grupos. El esquema de colores del mapa de calor se basó en los valores máximo y mínimo de F_{st} . (E y F) PCA de 94 muestras de *P. falciparum*. Los tres análisis se realizaron con el *barcode* de SNPs del ensayo AmpliSeq (A, C, E) o con MS (B, D, F). Los patrones observados fueron similares entre MS y SNPs en todos los parámetros. Los SNPs tuvieron mejor resolución que los MS para diferenciar clústeres.

Se investigó la estructura poblacional considerando solo las muestras de *P. falciparum* en NJ. Solo al usar los SNPs, se pudo notar un clúster claramente diferenciado compuesto solo por muestras de febrero 2020 en el PCA (Fig. S7), de forma similar al Clúster 2 observado en la Fig. 6. Sin embargo, dicho clúster estuvo más disperso y no se diferenció fácilmente al usar MS.

VIII. DISCUSIÓN

Las comunidades remotas e indígenas representan un desafío para las estrategias para la eliminación de malaria implementadas actualmente en la Amazonía peruana (MINSA, 2022b). En esta tesis se ha caracterizado la epidemiología, la dinámica de transmisión, los marcadores de resistencia y la delección de los genes *pfhrp2/3* de los parásitos de la malaria en la comunidad Ashuar Nueva Jerusalén (NJ) desde noviembre de 2019 a mayo de 2020. A nuestro conocimiento, este estudio representa el primer reporte de vigilancia genómica de malaria en una comunidad nativa en Loreto.

8.1 Epidemiología de la malaria en NJ

Un dato relevante sobre la epidemiología de la malaria en NJ es la alta prevalencia de la enfermedad (Tabla 7), superando reportes previos en Cahuide y Lupuna (prevalencia < 10%), comunidades de la Amazonía peruana (Ferreira *et al.*, 2022), pero comparable a estudios en Libertad, Visto Bueno y Urco Miraño (30 – 40%, Rosas-Aguirre *et al.*, 2021).

Otra característica importante de la malaria en NJ es la persistencia de la enfermedad, tanto en la detección pasiva como activa de casos (Fig. 3). A pesar del diagnóstico continuo en el campo y la intervención con 3 visitas de ACD, el número de casos de malaria se mantuvo sin cambios (Fig. 4). Este resultado contrasta con un reporte anterior en Mazán, donde 4 visitas consecutivas de ACD lograron reducir la prevalencia de la enfermedad en poco tiempo (Moreno-Gutiérrez *et al.*, 2018).

8.2 Transmisión de *P. vivax* en NJ

El análisis de genética poblacional mostró que la población de *P. vivax* en NJ tuvo una diversidad moderada, con una alta proporción de infecciones policlonales, pero sin diferencias entre la ACD en 2019 y la PCD en abril/mayo de 2020 (Fig. 5). Esto muestra que varios linajes de parásitos están circulando en la comunidad. Esto es característico en poblaciones de alta transmisión, como lo es NJ, donde este escenario favorece la recombinación y, por lo tanto, aumenta la diversidad genética (Barry *et al.*, 2015; Auburn *et al.*, 2021). Similar a NJ, las poblaciones de *P. vivax* en la Amazonía peruana se han caracterizado por ser heterogéneas, con diversidad moderada a alta y una alta proporción de infecciones policlonales (Kattenberg *et al.*, 2023; Delgado-Ratto *et al.*, 2016; Manrique *et al.*, 2019), aunque un estudio reciente reportó una población monoclonal con baja diversidad en Iquitos y Mazán (Villena *et al.*, 2022).

La malaria por *P. vivax* no pudo ser controlada en NJ. La intervención de las visitas de ACD no solo no logró disminuir el número de casos, sino que tampoco tuvo efecto sobre las características genéticas de los parásitos. Algunas razones pueden explicar estos resultados. Durante la colección de muestras en la comunidad, la mayor proporción de personas corresponde a menores de 15 años (Tabla 7), lo que muestra que los adultos no se encuentran permanentemente en NJ. Esto se refleja en la baja cobertura en cada visita de ACD (Fig. 4). Además, al finalizar las intervenciones de ACD, la cobertura acumulada fue $> 90\%$, lo que indica que los adultos que salen, van regresando a la comunidad continuamente. La continua movilización hace que el cumplimiento del tratamiento sea complicado, y hace posible la importación de nuevas variantes genéticas de parásitos a NJ. El potencial

incumplimiento del tratamiento podría incluso generar la aparición de resistencia a los fármacos utilizados (WHO, 2022). Respecto a ello, la adherencia al tratamiento es baja incluso en comunidades más cercanas a Iquitos (Grietens *et al.*, 2010). Muchas veces las personas dejan de tomar los medicamentos cuando se mejoran los síntomas para evitar los efectos secundarios, así como para guardar los medicamentos para futuras infecciones. En el caso de NJ, si bien el esquema de tratamiento completo era entregado al momento del diagnóstico, es probable que no lo hayan terminado debido a su movilización fuera de la comunidad. Por otro lado, los nuevos parásitos pueden contribuir a la diversidad genética y la persistencia de la enfermedad. Esto es particularmente notorio en comunidades remotas, como se reportó para las comunidades del río Alto Juruá en Brasil (Gomes *et al.*, 2020).

8.3 Transmisión de *P. falciparum* en NJ

La dinámica de transmisión de *P. falciparum* en NJ fue diferente a la de *P. vivax*. El análisis de genética de poblaciones mostró 3 clústeres que reflejan cambios durante el tiempo de estudio (Fig. 6). El Clúster 2 (compuesto principalmente por muestras de febrero de 2020) fue claramente diferenciado de muestras colectadas anterior y posteriormente en la comunidad. Además, la red de IBD mostró que algunas muestras de este grupo estaban relacionadas con muestras de Andoas en 2018, que es parte de una de las pocas vías de acceso a NJ. Esta información sugiere que este grupo corresponde a un “brote” de *P. falciparum* que apareció en febrero de 2020 en NJ. Nuestra hipótesis es que se introdujo un nuevo parásito (potencialmente desde Andoas, no relacionado con muestras anteriores), se propagó rápidamente en la comunidad (aumento de muestras recolectadas por PCD en ese

momento, alta proporción de infecciones policlonales) y luego fue controlado con éxito (genéticamente no relacionado con muestras posteriores, baja diversidad). Desafortunadamente, la falta de más datos epidemiológicos no permite verificar esta hipótesis. Anteriormente, algunos brotes de *P. falciparum* se han reportado en zonas no endémicas de Perú (Baldeviano *et al.*, 2015; Okoth *et al.*, 2016) y en una zona indígena de Amazonas (Montenegro *et al.*, 2021).

Por otro lado, el Clúster 3 (con muestras de marzo a mayo 2020) mostró una baja diversidad, una alta diferenciación y características únicas comparadas con los otros clústeres. Siguiendo con nuestra hipótesis, controlar el brote de febrero (Clúster 2) representó un cuello de botella en la población de *P. falciparum* en NJ, similar a lo reportado previamente en Colombia y Honduras-Nicaragua (Pinto *et al.*, 2021; Murillo Solano *et al.*, 2015). Algunos microscopistas expertos estuvieron presentes en el centro de salud de la comunidad durante el periodo de estudio para mejorar el desempeño del diagnóstico. De esta forma, los parásitos que pudieron escapar del diagnóstico por microscopía podrían haberse quedado en la comunidad luego del cuello de botella, lo que explica las características del Clúster 3.

8.4 Estrategias para controlar la malaria en NJ

Dada la dinámica de transmisión heterogénea de *P. vivax* y *P. falciparum* en NJ, nuevas estrategias deben ser propuestas para controlar la malaria en la comunidad. Además de propuestas como mejores campañas de socialización y educación, medidas para el control de vectores y limpieza del medio ambiente (eliminación de fuentes de agua que puedan servir como criaderos de mosquitos), se deben diseñar estrategias enfocadas en los adultos (la población móvil) de NJ. Ellos deben ser diagnosticados y tratados tan pronto como regresen a la comunidad. Esto podría

evitar la aparición y propagación de nuevas variantes de parásitos y reduciría la transmisión de la enfermedad. Actualmente, el tratamiento de la malaria dura 3 a 7 días en Perú (MINSA, 2015), lo que podría representar un problema para monitorear el cumplimiento del mismo. Una opción ante esto es el uso de un solo tratamiento estándar (Fernandez-Miñope et al., 2021). El esquema de tratamiento de una sola dosis de taquenoquina, junto con el test de la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), ha sido probada en el Perú y otros países y ha mostrado ser eficaz para la cura radical de la malaria por *P. vivax* (Lacerda et al., 2019; Llanos-Cuentas et al., 2019), por lo que puede ser usada potencialmente en el futuro. Estudios similares deben realizador para probar tratamientos de una sola dosis para *P. falciparum* (Llanos-Cuentas et al., 2018).

El MINSA ha implementado la capacitación de agentes comunitarios de salud (ACSs), personas elegidas por su propia comunidad para desarrollar acciones de prevención de enfermedades y ayudar al diagnóstico y tratamiento, en el actual programa de eliminación de la malaria (MINSA, 2022b). Estrategias similares han sido utilizados para controlar la malaria en poblaciones móviles en Myanmar (Kheang *et al.*, 2018) y en un área indígena de Panamá (Bhavnani *et al.*, 2022), logrando buenos resultados. En Perú, los ACS pueden tener un mejor entendimiento de las dinámicas de movilización de la comunidad, facilitando el trabajo en esa clase de poblaciones. Sin embargo, se requiere que se capacite a un número adecuado de ACS por localidad, que se destine a tiempo la cantidad de recursos suficientes, y que se monitoree continuamente el trabajo de los ACS para asegurar el éxito de esta estrategia.

De manera similar a los estudios de vigilancia molecular, los trabajos usando métodos cualitativos solo se concentran en comunidades periurbanas (Newell *et al.*, 2018; Iyer *et al.*, 2019). En Perú, se han realizado algunos estudios focalizados en poblaciones nativas en Sucusari, una comunidad indígena Maijuna (Hogan, 2020) y en comunidades nativas del distrito de Río Santiago (Paredes, 2022). De esta forma, también es recomendable realizar estudios cualitativos en áreas indígenas para conocer su percepción sobre la malaria, usos y costumbres. Durante el trabajo de campo, los pobladores de NJ indicaban que los adultos se movilizaban continuamente de la comunidad para actividades económicas o sociales. Realizar estudios cualitativos para entender el comportamiento de movilidad en NJ puede demostrar dichas afirmaciones y puede ayudar a lograr una mejor adaptación de las estrategias a implementarse (Cardona-Arias *et al.*, 2020).

8.5 Dinámica de transmisión de malaria en otras áreas remotas

Con respecto a las otras áreas remotas, la transmisión de *P. vivax* en Yavarí (ubicada cerca de la triple frontera Perú, Brasil y Colombia) en 2018 se caracterizó como una población clonal (baja diversidad genética, alta diferenciación genética, más del 90% de IBD compartido entre todas las muestras) (Fig. 11). Las muestras analizadas en este estudio podrían representar un brote surgido en la comunidad de Islandia. Se recolectaron más de 160 muestras por PCD (personas con síntomas que acudieron al puesto de salud) del 12 al 21 de diciembre en Islandia, lo que es un indicio de un brote en ese momento. Desafortunadamente, no hay más datos epidemiológicos para verificar esta hipótesis. Anteriormente, se ha sido reportado que estas muestras tienen relación y ancestría con parásitos de Brasil (Kattenberg *et al.*, en prep.).

De esta forma, es importante realizar estudios enfocados en esta comunidad, por su importancia fronteriza. Algunas actividades económicas aquí son ilegales: tala, narcotráfico, etc. (López y Tuesta, 2015). Como resultado, las personas pueden ser más reacias a compartir información y tener control sobre su movilidad, lo que dificultaría la implementación de estrategias en estos grupos para combatir la malaria.

Por otro lado, las muestras de *P. falciparum* de Santa Emilia se relacionaron con NJ y Mazán. Previamente, se ha informado la existencia de “corredores” de malaria por *P. vivax* en Perú, que incluía a Santa Emilia, Cahuide y Lupuna (Manrique *et al.*, 2019). Aunque este concepto también podría aplicarse a *P. falciparum*, es sorprendente que dicho corredor llegue a lugares tan difíciles de alcanzar como NJ. La baja diversidad de *P. falciparum* en Perú reportada en este trabajo (Fig. 12), que coincide con varios reportes previos (Villena *et al.*, 2022; Kattenberg *et al.*, 2023; Branch *et al.*, 2011), podría explicar por qué se encontró relación genética en comunidades ubicadas a gran distancia.

8.6 Marcadores moleculares de resistencia a antimaláricos

Para *P. falciparum*, los haplotipos más frecuentes para los genes *pfdhfr*, *pfdhps*, *pfmdr1* y *pfert* se asociaron a resistencia: RICNI (*pfdhfr*) a la sulfadoxina, SGEGA (*pfdhps*) a la pirimetamina (Heinberg y Kirkman, 2015), NDFCDY (*pfmdr1*) y SVMNT (*pfert*) a cloroquina (Fidock *et al.*, 2000; Adamu *et al.*, 2020). Se ha reportado un aumento de la frecuencia de estos haplotipos en estudios previos en los últimos años (Kattenberg *et al.*, 2023; Villena *et al.*, 2022).

Afortunadamente, ninguno de los fármacos es utilizado en el actual esquema de tratamiento contra *P. falciparum* en el Perú (MINSa, 2015). En este sentido, en este trabajo no se ha encontrado ninguna mutación validada para la resistencia a la artemisinina. Esto concuerda con recientes reportes de vigilancia del gen *pfk13* en Perú, donde tampoco se ha encontrado evidencia al respecto (Kattenberg *et al.*, 2023; Villena *et al.*, 2022; Sandoval-Bances *et al.*, 2023).

El ensayo Pv AmpliSeq incluye marcadores putativos asociados a la resistencia. La mayoría de ellos corresponden a ortólogos de genes en *P. falciparum* asociados a resistencia. Solo dos marcadores están validados para *P. vivax*: *pvdhps* (posiciones 383 y 553) y *pvdhfr* (positions 57, 58, 61, 117 and 173) para sulfadoxina y pirimetamina (SP), respectivamente (Buyon *et al.*, 2021). En cualquier caso, es importante seguir monitorizando las mutaciones presentes en estos marcadores ya que pueden llegar a ser relevantes para la resistencia.

La mutación A553G en *pvdhps* y las mutaciones S58R, S117N y I173L en *pvdhfr* estuvieron presentes en 33 - 95% de las muestras de NJ y Mazán, lo que es comparable a un estudio previo (Villena *et al.*, 2022). La presencia de mutaciones asociadas a resistencia a SP en *P. vivax* puede ser explicada por la exposición a los fármacos debido a infecciones mixtas o un mal diagnóstico (Alam *et al.*, 2007), aunque se ha dejado de usar SP contra *P. falciparum* hace más de 20 años (Durand *et al.*, 2018). En el caso de *pvm-dr1*, el haplotipo LMYF fue el más abundante (69 – 77%) en NJ y Mazán, consistente con reportes de vigilancias de este gen en muestras de 2006 a 2019 en la Amazonía peruana (Villena *et al.*, 2022; Villena *et al.*, 2020).

8.7 Genotipificación de HRP2/3

El primer reporte de la delección en los genes *pfhrp2/3* y su relación con fallas en pruebas de diagnóstico rápido fue en Perú (Gamboa *et al.*, 2010). Desde ese reporte, la frecuencia de estas delecciones en el país se ha incrementado desde el 2012 hasta llegar al 70% (Bendezu *et al.*, 2022; Valdivia *et al.*, 2022; Kattenberg *et al.*, 2023a). En contraste con ello, la moderada proporción con los genes *pfhrp2/3* (50 – 67%) muestra que las delecciones aún no se han extendido a comunidades más remotas como NJ. En nuestro estudio, la doble delección solo predominó en Mazán, lo cual concuerda con estudios previos en esa localidad (Bendezu *et al.*, 2022).

8.8 Comparación del ensayo AmpliSeq con otros métodos de genotipificación

Se han encontrado resultados muy contrastantes en la genotipificación de *pfhrp2/3* entre la PCR y el ensayo AmpliSeq. Varias razones podrían explicar esto. La homología, la repetitividad y las secuencias con alto %AT de ambos genes dificultan el alineamiento, que parece ser más propenso hacia *pfhrp3* que a *pfhrp2*. Como consecuencia, el ensayo Pf AmpliSeq puede sobreestimar la presencia de *pfhrp3* y la delección de *pfhrp2*, lo que se observa en este estudio.

Además, la PCR utilizada en este trabajo solo amplifica el exón 2 de cada gen (Ayinki *et al.*, 2013) y, por lo tanto, es posible que no considere tipos de delecciones. Un estudio ha encontrado puntos de ruptura para las delecciones en ambos genes, los cuales varían por zona geográfica. En el caso de *pfhrp2*, la delección se explica por el proceso de recuperación de los telómeros y los puntos de ruptura están en el exón 2 en Perú. Por tanto, se espera una delección parcial del gen *pfhrp2*. Por otro lado,

para *pfhrp3*, la delección en Perú se explica por una recombinación con el cromosoma 11, por lo que se espera una delección total (MalariaGEN et al., 2023). Estudios futuros pueden enfocarse en la naturaleza, el origen y la evolución de la delección de estos genes en el país. En cualquier caso, es necesario mejorar el ensayo Pf AmpliSeq para proporcionar una genotipificación más precisa de *pfhrp2/3*.

Respecto a la comparación del *barcode* de SNP del ensayo AmpliSeq y los microsatélites (MS), se encontraron diferencias en la resolución genética de los marcadores por especie (Fig. 11 y 12). Estudios anteriores han comparado dichos marcadores en poblaciones de *Plasmodium*, con resultados disímiles. Así, se ha reportado que los SNPs tienen mejor resolución de los MS en *P. vivax* de Papua Nueva Guinea en 2012-14 (Fola et al., 2020). Por otro lado, los SNPs y los MS pudieron agrupar correctamente cepas de *P. falciparum* de África, pero solo los SNPs clasificaron correctamente las cepas de Sudamérica y Centroamérica (Kanna et al., 2022). Por el contrario, los SNPs tuvieron menor resolución genética para identificar cambios luego de una intervención a una población de *P. falciparum* en Ghana (Ghansah et al., 2023). Estos distintos resultados, al comparar SNPs y MS, no solo se dan en *Plasmodium*, sino también en una gran variedad de especies, desde animales (Ling et al., 2020; Kaiser et al., 2016; Coates et al., 2009), hongos (Naegele et al., 2021) y plantas (Tereba y Konecka, 2021).

Distintas razones pueden explicar estos resultados. En primer lugar, la calidad de información de un grupo de marcadores puede cambiar en el tiempo o lugares diferentes. Como ejemplo, nuestro grupo de investigación ha trabajado con dos sets de MS para *P. vivax*, y ha encontrado diferencias en la eficiencia de amplificación

y la informatividad al probar muestras de distintas comunidades de Loreto (Delgado-Ratto *et al.*, 2016, Manrique *et al.*, 2019). Por otro lado, al tratar de usar un set de microsatélites, probado en países de África y el sudeste asiático (Anderson *et al.*, 2000), en muestras de la Amazonía peruana resultó en bajas eficiencias de amplificación (Quispe Carbajal, 2017). Esto trae como consecuencia que los marcadores deben ser validados siempre en nuevos escenarios para luego escoger aquellos con mejor desempeño.

Algo similar ocurre con los SNP, cuya frecuencia e informatividad varían entre países (Taylor *et al.*, 2019). De esa forma, por ejemplo, se han desarrollado ensayos AmpliSeq de *P. vivax* particulares para Vietnam (Kattenberg *et al.*, 2022) y Perú (Kattenberg *et al.*, en prep.) con *barcodes* de SNPs específicos a cada país puesto que no son intercambiables. La opción de usar un set de SNP “global” se descarta porque se necesita de una alta resolución para diferenciar casos autóctonos e importados dentro de un país, lo cual será necesario mientras más cerca a la eliminación se vaya acercando (Auburn *et al.*, 2021).

Otros motivos que explican las diferencias al comparar SNPs y MS son la cantidad de cada marcador utilizados, las características genéticas y reproductivas de las especies, la diferencia en tasa de mutación y los factores ambientales como la ubicación geográfica. Finalmente, es importante resaltar que además de evaluar la resolución genética, es importante considerar el costo-efectividad de cada marcador: usualmente la genotipificación con SNPs es más caro que con MS, así como que los resultados se obtienen más rápido y menos trabajoso (Kanai *et al.*, 2022), así como probar otros tipos de marcadores (Ghansah *et al.*, 2023).

8.9 Relevancia

La importancia de este estudio radica principalmente en que brinda gran cantidad de información de cómo es el estado de la malaria en una comunidad indígena de la Amazonía peruana. Se ha mostrado que las características epidemiológicas y genéticas de las poblaciones de *Plasmodium* en NJ son distintas a lo usualmente observado en otras comunidades con más fácil acceso, e incluso con otras comunidades remotas. Sin embargo, se debe tener en consideración que, dado la heterogeneidad de la enfermedad en nuestro país, lo encontrado en NJ no necesariamente será igual en otras comunidades nativas. Por ello, es importante seguir realizando estudios en otras zonas con poblaciones indígenas, por ejemplo, la provincia del Datem de Marañón en Loreto (Conn *et al.*, 2023) y la provincia de Concorcanqui en Amazonas (Montenegro *et al.*, 2021).

Además, nuestros resultados incentivan a que la vigilancia molecular pueda ser incorporada al sistema de vigilancia del plan nacional de eliminación de malaria en Perú. Algunos antecedentes indican que es posible incorporar la vigilancia molecular de malaria en sistemas de salud a nivel nacional. En Mozambique, un grupo de investigadores diseñaron un protocolo para la implementación de un sistema de vigilancia molecular usando una plataforma de NGS para investigar marcadores de resistencia, deleciones *pfhrp2/3* y dinámica de transmisión en *P. falciparum*. El estudio considera los diferentes niveles de transmisión en el país para el muestreo, así como los pasos para la integración en el programa nacional de control (Mayor *et al.*, 2022). Dicho protocolo puede servir como insumo para diseñar uno adaptado al contexto peruano. Además, en 2019, 8 países endémicos

de malaria de la región del Asia Pacífico se reunieron en un taller para discutir la factibilidad de implementar diversas herramientas de vigilancia molecular. Como conclusiones, se necesita que haya una colaboración extensa a nivel local para compartir el conocimiento a nivel técnico sobre las metodologías y los análisis bioinformáticos. Asimismo, se necesita la colaboración con los grupos de investigación locales e internacionales para aumentar el impacto de los resultados y explorar la costo-efectividad de dichas herramientas (Noviyanti *et al.*, 2020). Debido a la ubicación geográfica y el contexto sociocultural, la participación de los diferentes actores, en particular del Ministerio de Salud, es crucial para que esto se lleve a cabo con éxito (Naing *et al.*, 2018). En nuestro contexto, la iniciativa GenMal (The Genetic Network for Malaria Elimination, <https://www.genmal.org/index.html>) es un consorcio de instituciones peruanas e internacionales que realizan actividades de vigilancia de la malaria como parte de sus actividades de investigación, que coordina y provee de evidencia científica al programa de eliminación del MINSa. Si bien no se ha logrado una implementación completa en el sistema de salud de Perú, sí se ha podido realizar diversos estudios de vigilancia molecular bajo este consorcio (Villena *et al.*, 2022; Kattenberg *et al.*, 2023a), cuyos resultados se han comunicado oportunamente a las autoridades de salud en talleres de difusión (<https://imtavh.cayetano.edu.pe/noticias/reunion-de-difusion-de-resultados-de-investigaciones-realizados-por-el-instituto-de-medicina-tropical-alexander-von-humboldt-organizado-por-el-proyecto-fa5/>). Finalmente, un ejemplo más práctico de la implementación de vigilancia molecular de malaria se ha llevado a cabo en Haití. En colaboración con su Ministerio de Salud, se seleccionaron 11 sitios centinelas distribuidos en el país, y se recolectaron muestras

de pacientes con malaria por *P. falciparum* de 2016 al 2018. Usando la secuenciación por el método de Sanger, no se detectó mutaciones asociadas a resistencia en CQ, y solo una muestra (0.1%) tuvo múltiples mutaciones asociadas a resistencia en SP (Hamre et al., 2020; Rogier et al., 2020). En relación con ello, nuestro estudio muestra que los ensayos AmpliSeq pueden ser utilizados para la vigilancia molecular de malaria en la Amazonía peruana, no solo para estudiar los marcadores de resistencia, sino también para analizar la dinámica de transmisión.

8.10 Limitaciones

Este trabajo tiene algunas limitaciones. En primer lugar, el diseño del estudio en NJ. Inicialmente, se planeó realizar un estudio de eficacia del tratamiento en la comunidad, siguiendo una cohorte durante 2 años. Después de llegar a la comunidad a finales de 2019, nuestro equipo se centró en prepararse para el trabajo futuro. Debido a esto, se recolectaron muestras como parte de las intervenciones del MINSA y no se recolectaron datos epidemiológicos adicionales. Desafortunadamente, todo el trabajo se detuvo debido a la pandemia de COVID.

En segundo lugar, se ha utilizado un muestreo por conveniencia, lo que llevó a analizar diferentes tamaños de muestra por lugar y muestras con diferentes métodos y tiempos de recolección. Las muestras de cada área se seleccionaron proporcionalmente al número total de muestras disponibles. Debido a los altos costos de secuenciación (\$185 por muestra, Kattenberg et al., 2023), solo realizamos una corrida del ensayo AmpliSeq por especie. Hoy en día, el uso de consorcios internacionales (como MalariaGEN) o la remisión a empresas privadas para la secuenciación es más común en países donde los costos son altos o la

infraestructura es escasa. Además, se debe considerar la heterogeneidad de la transmisión de la malaria en el Perú para que la vigilancia molecular sea representativa del país (Kattenberg et al., 2023). Para calcular el tamaño de la muestra para este tipo de estudios se debe considerar la pregunta de investigación, la forma de muestreo (transversal o periódico) y cómo se expresarán los resultados (Wohl et al., 2023). En nuestro estudio, se debió analizar 96 muestras por especie de *Plasmodium* y por localidad, lo cual no fue posible lograrlo.

Además, nuestros resultados muestran que el ensayo Pf AmpliSeq Perú necesita mejorarse en varios aspectos. En primer lugar, 11 de los 28 SNP del *barcode* estaban fijos en todas las áreas, similar a lo reportado en el estudio original (Kattenberg et al., 2023), y ya no contribuirían a investigar la diversidad genética. De esta manera, lo ideal sería incrementar el *barcode* hasta 40 – 42 SNP como el ensayo de *P. vivax* (Kattenberg et al., 2022). Además, el gen *pfprt* no pudo genotipificarse en el 35% de las muestras. Se deben realizar más estudios para investigar posibles polimorfismos en este gen que podrían explicar la falta de amplificación.

Finalmente, demostramos que el ensayo no pudo genotipificar los genes *pfhrp2/3* de manera eficiente como PCR. Realizar cambios en el algoritmo de genotipificación, utilizando ejemplos basados en secuenciación del genoma completo (Stabler et al., 2022; Sevúlpeda et al., 2018) o sondas de inversión molecular (Feleke et al., 2021), y aumentando las regiones amplificadas, incluyendo los genes flanqueantes a *pfhrp2/3*, pueden ayudar a mejorar el ensayo. Además, originalmente solo se utilizaron 10 muestras para establecer umbrales de clasificación en el trabajo original (Kattenberg et al., 2023a). Aunque la

concordancia entre AmpliSeq y PCR fue adecuada, el tamaño de la muestra fue bajo y puede no representar un alto poder estadístico, por lo que se deben utilizar más muestras en la validación de un nuevo algoritmo con resultados de PCR. Actualmente, se está trabajando para mejorar todos estos aspectos para los ensayos Pf AmpliSeq de África y Vietnam.

IX. CONCLUSIONES

En conclusión, este trabajo muestra las diferencias entre las poblaciones de *P. vivax* y *P. falciparum* presentes en Nueva Jerusalén (NJ), una comunidad indígena en la Amazonía peruana, desde finales de 2019 hasta el inicio de la pandemia del COVID 19. La transmisión de malaria en NJ fue alta y persistente durante todo el tiempo del estudio. La intervención de ACD al comienzo del estudio no pudo reducir el número de casos en un corto período de tiempo.

También, se notó que la dinámica de transmisión de *P. vivax* y *P. falciparum* en NJ difieren entre sí. La transmisión local de *P. vivax* en NJ tuvo una diversidad genética moderada, sin diferencias genéticas en el tiempo. Por el contrario, identificamos una población de *P. falciparum* con baja diversidad y con subestructuración con clústeres temporales. Uno de ellos representó un brote en febrero 2020, que pudo controlarse mediante un diagnóstico por microscopía por parte del personal del estudio bien capacitado por el MINSA.

Los marcadores moleculares en *P. falciparum* mostraron resistencia a cloroquina y sulfadoxina-pirimetamina, pero no se encontró evidencia de resistencia a la artemisina. Adicionalmente, la presencia de los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* fue frecuente en NJ y otras áreas remotas, excepto en Mazán, donde predominó la doble delección. Finalmente, se determinó que el *barcode* de SNP de los ensayos AmpliSeq tiene una mejor resolución genética que los microsatélites para *P. falciparum*; y fueron similares para *P. vivax*. Sin embargo, se demostró que el ensayo AmpliSeq no es tan eficiente para genotipificar los genes *pfhrp2/3* como al hacerlo con PCR.

Toda esta información es importante ya que resalta la importancia de realizar vigilancia periódica en las comunidades indígenas, preferentemente de la mano de las actividades del MINSA, para investigar importación de infecciones, la dinámica de transmisión, la propagación de resistencia, etc. Ello permitiría adaptar oportunamente las estrategias de eliminación de la malaria en el Perú. Se ha mostrado que los ensayos AmpliSeq pueden ser útiles para este fin, aunque algunas limitaciones como el costo y la genotipificación de algunos genes específicos deben ser consideradas para mejorar dichas plataformas para su posterior implementación al sistema nacional de vigilancia de malaria.

X. RECOMENDACIONES

En primer lugar, se recomienda mejorar el diseño de estudio tanto en Nueva Jerusalén (NJ) como para la vigilancia molecular en zonas remotas. Respecto a NJ, preferentemente de la mano de las actividades del MINSA, se debe realizar detección por colección pasiva y activa de manera más sistematizada, además de realizar barridos comunitarios que incluyan encuestas sociodemográficas y de movilización. Dichas actividades pueden estar complementadas con diagnóstico molecular en el campo, por ejemplo, con técnicas como la amplificación mediada por lazos (LAMP). Ello nos permitirá conocer la transmisión de la malaria con mayor exactitud y sobre todo, entender el comportamiento de movilidad humana en la comunidad. Sobre la vigilancia molecular, se requiere que se incremente tanto la cantidad de muestras como la cantidad de áreas a estudiar. Un enfoque donde se utilice diversos puntos satélites para colectar muestras y luego enviar a laboratorios regionales de referencia puede ser óptimo.

En segundo lugar, los ensayos AmpliSeq, en particular el de *P.falciparum*, necesita algunas mejoras. Entre ellas, se recomienda incrementar el número de SNPs del *barcode*, rehacer el algoritmo para la determinación de la delección de los genes *pfhrp2/3*, revisar *in silico* los posibles cambios de polimorfismos en secuencias genómicas previamente reportadas que pueden afectar la amplificación de ciertos genes como *pfcr1*, etc. Otra recomendación asociada al ensayo es buscar maneras de que costo por muestra sea menor. Ello puede conseguirse probando enzimas para el paso de amplificación múltiple, comprobar el uso de pools de muestras, entre otros. Una vez lograda estas mejoras, sería ideal implementar dichos dentro del

sistema de vigilancia de malaria en el país. Para eso, se debe trabajar juntamente con el Instituto Nacional de Salud (INS).

Asimismo, son necesarias estrategias específicas para combatir la malaria en NJ. En este trabajo, se han discutido algunas, sobre todo las enfocadas al estudio de la población móvil en la comunidad, la cual probablemente es la causa principal de la transmisión alta y persistente de malaria. La implementación de los agentes comunitarios de salud puede ser clave para ello, aunque se necesita de un monitoreo constante y riguroso. Además, también se recomienda realizar investigación cualitativa para comprender las percepciones y comportamiento de las personas que viven en comunidades indígenas y así complementar la información molecular. Finalmente, se debe recalcar que este tipo de estudios moleculares a nivel microepidemiológico se deben realizar estableciendo puntos centinelas para hacer la vigilancia de forma conglomerada por cuencas o ríos, puesto que los resultados encontrados en NJ no pueden ser llevados necesariamente a las demás zonas nativas.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adamu A, Jada MS, Haruna HMS, Yakubu BO, Ibrahim MA, Balogun EO, et al. Plasmodium falciparum multidrug resistance gene-1 polymorphisms in Northern Nigeria: implications for the continued use of artemether-lumefantrine in the region. *Malar J.* 2020 Nov 30;19(1):439.
2. Afshar M, Zakeri S, Pirahmadi S, Djadid ND: Molecular assessment of dhfr/dhps mutations among Plasmodium vivax clinical isolates after introduction of sulfadoxine/pyrimethamine in combination with artesunate in Iran. *Infect Genet Evol.* 2012, 12: 38-44.
3. Ahmed S, Reithinger R, Kaptoge SK, Ngondi JM. Travel Is a Key Risk Factor for Malaria Transmission in Pre-Elimination Settings in Sub-Saharan Africa: A Review of the Literature and Meta-Analysis. *Am J Trop Med Hyg.* 2020 Oct;103(4):1380-1387.
4. Akinyi S, Hayden T, Gamboa D, Torres K, Bende J, Abdallah JF, et al. Multiple genetic origins of histidine-rich protein 2 gene deletion in Plasmodium falciparum parasites from Peru. *Sci Rep.* 2013 Sep 30;3:2797
5. Alam MT, Bora H, Bharti PK, Saifi MA, Das MK, Dev V, et al. Similar trends of pyrimethamine resistance-associated mutations in Plasmodium vivax and P. falciparum. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007, 51: 857-863. 10.1128/AAC.01200-06.
6. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data [Internet]. 2010. Disponible en: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

7. Argimón S, Abudahab K, Goater RJE, Fedosejev A, Bhai J, Glasner C, Feil EJ, Holden MTG, Yeats CA, Grundmann H, Spratt BG, Aanensen DM. Microreact: visualizing and sharing data for genomic epidemiology and phylogeography. *Microb Genom.* 2016 Nov 30;2(11):e000093.
8. Arnott A, Barry AE, Reeder JC. Understanding the population genetics of *Plasmodium vivax* is essential for malaria control and elimination. *Malar J.* 2012 Jan 10;11:14.
9. Ashley EA, Dhorda M, Fairhurst RM, Amaratunga C, Lim P, Suon S, et al. Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med.* 2014 Jul 31;371(5):411-23.
10. Auburn S, Benavente ED, Miotto O, Pearson RD, Amato R, Grigg MJ, et al. Genomic analysis of a pre-elimination Malaysian *Plasmodium vivax* population reveals selective pressures and changing transmission dynamics. *Nat Commun.* 2018 Jul 3;9(1):2585.
11. Auburn S, Cheng Q, Marfurt J, Price RN. The changing epidemiology of *Plasmodium vivax*: Insights from conventional and novel surveillance tools. *PLoS Med.* 2021 Apr 23;18(4):e1003560.
12. Awasthi G, Satya Prasad GB, Das A. Pfert Haplotipos and the evolutionary history of chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012 Feb;107(1):129-34.
13. Bacon DJ, McCollum AM, Griffing SM, Salas C, Soberon V, Santolalla M, et al. Dynamics of malaria drug resistance patterns in the Amazon basin region following changes in Peruvian national treatment policy for uncomplicated malaria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 May;53(5):2042-51.

14. Baird JK, Valecha N, Duparc S, White NJ, Price RN. Diagnosis and Treatment of Plasmodium vivax Malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2016 Dec 28;95(6 Suppl):35-51
15. Baker J, Ho M-F, Pelecanos A, Gatton M, Chen N, Abdullah S, et al. Global sequence variation in the histidine-rich proteins 2 and 3 of Plasmodium falciparum: implications for the performance of malaria rapid diagnostic tests. *Malar J.* 2010;9:129.
16. Baldeviano GC, Okoth SA, Arrospide N, Gonzalez RV, Sánchez JF, Macedo S, et al. Molecular Epidemiology of Plasmodium falciparum Malaria Outbreak, Tumbes, Peru, 2010-2012. *Emerg Infect Dis.* 2015 May;21(5):797-803
17. Barrandeguy ME, García MV. The Sensitiveness of Expected Heterozygosity and Allelic Richness Estimates for Analyzing Population Genetic Diversity. In: *Genetic Variation.* 2020. Disponible en URL: <https://www.intechopen.com/chapters/74804>
18. Barry AE, Waltmann A, Koepfli C, Barnadas C, Mueller I. Uncovering the transmission dynamics of Plasmodium vivax using population genetics. *Pathog Glob Health.* 2015 May;109(3):142-52.
19. Bendezu J, Torres K, Villasis E, Incardona S, Bell D, Vinetz J, et al. Geographical distribution and genetic characterization of pfhrp2 negative Plasmodium falciparum parasites in the Peruvian Amazon. *PLoS One.* 2022 Nov 22;17(11):e0273872.
20. Berry A, Benoit-Vical F, Fabre R, Cassaing S, Magnaval JF. PCR-based methods to the diagnosis of imported malaria. *Parasite.* 2008 Sep;15(3):484-8.

21. Bhavnani D, García Espinosa B, Baird M, Presley N, Le Menach A, Bradley C, Outten M, González O. Malaria surveillance and case management in remote and indigenous communities of Panama: results from a community-based health worker pilot. *Malar J.* 2022 Oct 21;21(1):297.
22. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014;30(15):2114-20.
23. Bousema T, Baidjoe A. Heterogeneity in malaria transmission: underlying factors and implications for disease control. 2013. In: *Ecology of parasite-vector interactions. Ecology and control of vector-borne diseases, vol 3.* Wageningen Academic Publishers, Wageningen.
24. Bousema T, Drakeley C. Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(2):377-410
25. Branch OH, Sutton PL, Barnes C, Castro JC, Hussin J, Awadalla P, et al. *Plasmodium falciparum* genetic diversity maintained and amplified over 5 years of a low transmission endemic in the Peruvian Amazon. *Mol Biol Evol.* 2011 Jul;28(7):1973-86.
26. Buyon LE, Elsworth B, Duraisingh MT. The molecular basis of antimalarial drug resistance in *Plasmodium vivax*. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2021 Aug;16:23-37.
27. Cardona-Arias JA, Salas-Zapata W, Carmona-Fonseca J. Systematic review of qualitative studies about malaria in Colombia. *Heliyon.* 2020 May 18;6(5):e03964.

28. Carrasquilla M, Early AM, Taylor AR, Knudson Ospina A, Echeverry DF, Anderson TJC, Mancilla E, Aponte S, Cárdenas P, Buckee CO, Rayner JC, Sáenz FE, Neafsey DE, Corredor V. Resolving drug selection and migration in an inbred South American *Plasmodium falciparum* population with identity-by-descent analysis. *PLoS Pathog.* 2022 Dec 21;18(12):e1010993.
29. Carrasco-Escobar G, Gamboa D, Castro MC, Bangdiwala SI, Rodriguez H, Contreras-Mancilla J, et al. Micro-epidemiology and spatial heterogeneity of *P. vivax* parasitaemia in riverine communities of the Peruvian Amazon: A multilevel analysis. *Sci Rep.* 2017;7(1):8082.
30. Casillas S, Barbadilla A. Molecular Population Genetics. *Genetics.* 2017 Mar;205(3):1003-1035.
31. Center for Vaccine Development (CVD). Protocol for microsatellite genotyping by unlinked markers. 2012. Disponible en URL: <http://www.medschool.umaryland.edu/media/SOM/Research-Centers/Center-for-Vaccine-Development-CVD/Division-of-Malaria-Research/docs/Microsatellite-genotyping-by-unlinked-markers.docx>
32. Chenet SM, Akinyi Okoth S, Huber CS, Chandrabose J, Lucchi NW, Talundzic E, et al. Independent Emergence of the *Plasmodium falciparum* Kelch Propeller Domain Mutant Allele C580Y in Guyana. *J Infect Dis.* 2016;213(9):1472-5.
33. Chenet SM, Schneider KA, Villegas L, Escalante AA. Local population structure of *Plasmodium*: impact on malaria control and elimination. *Malar J.* 2012;11:412.

34. Chu CS, White NJ. Management of relapsing *Plasmodium vivax* malaria. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2016 Oct;14(10):885-900.
35. Cingolani P, Platts A, Wang le L, Coon M, Nguyen T, Wang L, et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)*. 2012 Apr-Jun;6(2):80-92.
36. Cohen J. A Coefficient of Agreement for Nominal Scales. *Educational and Psychological Measurement*. 1960: 20, 37-46.
37. Cowell AN, Loy DE, Sundararaman SA, Valdivia H, Fisch K, Lescano AG, et al. Selective Whole-Genome Amplification Is a Robust Method That Enables Scalable Whole-Genome Sequencing of *Plasmodium vivax* from Unprocessed Clinical Samples. *mBio*. 2017 Feb 7;8(1):e02257-16.
38. Criscuolo A, Gascuel O. Fast NJ-like algorithms to deal with incomplete distance matrices. *BMC Bioinformatics*. 2008 Mar 26;9:166.
39. Dalmat R, Naughton B, Kwan-Gett TS, Slyker J, Stuckey EM. Use cases for genetic epidemiology in malaria elimination. *Malar J*. 2019 May 7;18(1):163
40. De Oliveira AM, Chavez J, de Leon GP, Durand S, Arrospide N, Roberts J, et al. Efficacy and effectiveness of mefloquine and artesunate combination therapy for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*. 2011 Sep;85(3):573-8.
41. Delgado-Ratto C, Gamboa D, Soto-Calle VE, Van den Eede P, Torres E, Sánchez-Martínez L, et al. Population Genetics of *Plasmodium vivax* in the Peruvian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Jan 14;10(1):e0004376.

42. Delgado-Ratto C, Soto-Calle VE, Van den Eede P, Gamboa D, Rosas A, Abatih EN, et al. Population structure and spatio-temporal transmission dynamics of *Plasmodium vivax* after radical cure treatment in a rural village of the Peruvian Amazon. *Malar J*. 2014 Jan 6;13:8.
43. Dray S, Dufour A-B. The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of statistical software*. 2007;22(4):1–20.
44. Durand S, Lachira-Alban A, Sánchez CC. Impacto de diferentes esquemas terapéuticos sobre la malaria en la costa y amazonia peruana, en el marco de una política de medicamentos antimaláricos, 1994-2017. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2018 Jul-Sep;35(3):497-504.
45. Edwards HM, Dixon R, Zegers de Beyl C, Celhay O, Rahman M, Myint Oo M, et al. Prevalence and seroprevalence of *Plasmodium* infection in Myanmar reveals highly heterogeneous transmission and a large hidden reservoir of infection. *PLoS One*. 2021 Jun 9;16(6):e0252957.
46. Escalante AA, Ferreira MU, Vinetz JM, Volkman SK, Cui L, Gamboa D, et al. Malaria Molecular Epidemiology: Lessons from the International Centers of Excellence for Malaria Research Network. *Am J Trop Med Hyg*. 2015 Sep;93(3 Suppl):79-86.
47. Fernandez-Miñope C, Delgado-Ratto C, Contreras-Mancilla J, Ferrucci HR, Llanos-Cuentas A, Gamboa D, Van Geertruyden JP. Towards one standard treatment for uncomplicated *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria: perspectives from and for the peruvian amazon. *Int J Infect Dis*. 2021;105(4):293-7.

48. Ferreira MU, Corder RM, Johansen IC, Kattenberg JH, Moreno M, Rosas-Aguirre A, et al. Relative contribution of low-density and asymptomatic infections to *Plasmodium vivax* transmission in the Amazon: pooled analysis of individual participant data from population-based cross-sectional surveys. *Lancet Reg Health Am*. 2022 May;9:100169.
49. Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, et al. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell*. 2000 Oct;6(4):861-71.
50. Figueroa-Ildefonso E. Identificación de huellas de selección en *Plasmodium falciparum* de la Amazonía Peruana. Master in Biochemistry and Molecular Biology thesis, Universidad Peruana Cayetano Heredia, (2023).
51. Flannery EL, Wang T, Akbari A, Corey VC, Gunawan F, Bright AT, et al. Next-Generation Sequencing of *Plasmodium vivax* Patient Samples Shows Evidence of Direct Evolution in Drug-Resistance Genes. *ACS Infect Dis*. 2015 Aug 14;1(8):367-79.
52. Fola AA, Kattenberg E, Razook Z, Lautu-Gumal D, Lee S, Mehra S, Bahlo M, Kazura J, Robinson LJ, Laman M, Mueller I, Barry AE. SNP barcodes provide higher resolution than microsatellite markers to measure *Plasmodium vivax* population genetics. *Malar J*. 2020 Oct 20;19(1):375.
53. Fola AA, Moser KA, Aydemir O, Hennelly C, Kobayashi T, Shields T, et al; Southern, Central Africa International Center of Excellence for Malaria Research (ICEMR). Temporal and spatial analysis of *Plasmodium falciparum*

genomics reveals patterns of parasite connectivity in a low-transmission district in Southern Province, Zambia. *Malar J.* 2023 Jul 7;22(1):208.

54. Gamboa D, Ho MF, Bendezu J, Torres K, Chiodini PL, Barnwell JW, et al. A large proportion of *P. falciparum* isolates in the Amazon region of Peru lack *pfhrp2* and *pfhrp3*: implications for malaria rapid diagnostic tests. *PLoS One.* 2010 Jan 25;5(1):e8091

55. Gendrot M, Fawaz R, Dormoi J, Madamet M, Pradines B. Genetic diversity and deletion of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 and 3: a threat to diagnosis of *P. falciparum* malaria. *Clin Microbiol Infect.* 2019 May;25(5):580-5.

56. Gomes MFC, Codeço CT, Bastos LS, Lana RM. Measuring the contribution of human mobility to malaria persistence. *Malar J.* 2020 Nov 11;19(1):404.

57. Goudet J, Jombart T, Kamvar ZN, Archer E, Hardy O. Package ‘hierfstat’. 2022. URL: <https://cran.r-project.org/web/packages/hierfstat/hierfstat.pdf>

58. Goudet J. FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *J Hered.* 1995;86(6):485–6

59. Griffing SM, Mixson-Hayden T, Sridaran S, Alam MT, McCollum AM, Cabezas C, Marquiño Quezada W, Barnwell JW, De Oliveira AM, Lucas C, Arrospide N, Escalante AA, Bacon DJ, Udhayakumar V. South American *Plasmodium falciparum* after the malaria eradication era: clonal population expansion and survival of the fittest hybrids. *PLoS One.* 2011;6(9):e23486.

60. Grünwald NJ, Everhart SE, Knaus BJ, Kamvar ZN. Best Practices for Population Genetic Analyses. *Phytopathology.* 2017 Sep;107(9):1000-1010.

61. Guerra CA, Citron DT, García GA, Smith DL. Characterising malaria connectivity using malaria indicator survey data. *Malar J.* 2019 Dec 23;18(1):440.

62. Guirou EA, Schindler T, Hosch S, Donfack OT, Yoboue CA, Krähenbühl S, et al. Molecular malaria surveillance using a novel protocol for extraction and analysis of nucleic acids retained on used rapid diagnostic tests. *Sci Rep.* 2020 Jul 23;10(1):12305
63. Haldar K, Bhattacharjee S, Safeukui I. Drug resistance in *Plasmodium*. *Nat Rev Microbiol.* 2018 Mar;16(3):156-170.
64. Hale ML, Burg TM, Steeves TE. Sampling for microsatellite-based population genetic studies: 25 to 30 individuals per population is enough to accurately estimate allele frequencies. *PLoS One.* 2012;7(9):e45170.
65. Hamre KES, Pierre B, Namuyinga R, Mace K, Rogier EW, Udhayakumar V, Boncy J, Lemoine JF, Chang MA. Establishing a National Molecular Surveillance Program for the Detection of *Plasmodium falciparum* Markers of Resistance to Antimalarial Drugs in Haiti. *Am J Trop Med Hyg.* 2020 Dec;103(6):2217-2223.
66. Haubold B, Hudson RR. LIAN 3.0: detecting linkage disequilibrium in multilocus data. *Linkage Analysis. Bioinformatics.* 2000;16(9):847–8.
67. Hedrick PW. Population genetics and ecology. In: *The Princeton guide to ecology.* 2009, Princeton University Press: Princeton. p. 109-116.
68. Heinberg A, Kirkman L. The molecular basis of antifolate resistance in *Plasmodium falciparum*: looking beyond point mutations. *Ann N Y Acad Sci.* 2015 Apr;1342(1):10-8.
69. Henden L, Lee S, Mueller I, Barry A, Bahlo M. Identity-by-descent analyses for measuring population dynamics and selection in recombining pathogens. *PLoS Genet.* 2018 May 23;14(5):e1007279.

70. Howes RE, Battle KE, Mendis KN, Smith DL, Cibulskis RE, Baird JK, et al. Global Epidemiology of *Plasmodium vivax*. *Am J Trop Med Hyg*. 2016 Dec 28;95(6 Suppl):15-34. doi: 10.4269/ajtmh.16-0141.
71. Huaman MC, Roncal N, Nakazawa S, Long TT, Gerena L, Garcia C, et al. Polymorphism of the *Plasmodium falciparum* multidrug resistance and chloroquine resistance transporter genes and in vitro susceptibility to aminoquinolines in isolates from the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*. 2004 May;70(5):461-6.
72. Imwong M, Pukrittayakamee S, Rénia L, Letourneur F, Charlieu JP, Leartsakulpanich U, et al. Novel point mutations in the dihydrofolate reductase gene of *Plasmodium vivax*: evidence for sequential selection by drug pressure. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 May;47(5):1514-21.
73. Imwong M, Suwannasin K, Kunasol C, Sutawong K, Mayxay M, Rekol H, et al. The spread of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in the Greater Mekong subregion: a molecular epidemiology observational study. *Lancet Infect Dis*. 2017;17(5):491-7.
74. Jiang T, Chen J, Fu H, Wu K, Yao Y, Eyi JUM, et al. High prevalence of Pfdhfr-Pfdhps quadruple mutations associated with sulfadoxine-pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* isolates from Bioko Island, Equatorial Guinea. *Malar J*. 2019 Mar 26;18(1):101.
75. Jombart T, Ahmed I. adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics*. 2011 Nov 1;27(21):3070-1. doi: 10.1093/bioinformatics/btr521.

76. Jombart T, Devillard S, Balloux F. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genet.* 2010;11:94.
77. Kamvar ZN, Tabima JF, Grunwald NJ. Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ.* 2014;2:e281
78. Kanaka KK, Sukhija N, Goli RC, Singh S, Ganguly I, Dixit SP, et al. On the concepts and measures of diversity in the genomics era. *Current Plant Biology.* 2023; 33:100278.
79. Kattenberg JH, Cabrera-Sosa L, Figueroa E, Mutsaers M, et al. Plasmodium vivax molecular surveillance in peruvian amazon with Pv AmpliSeq assay. In preparation.
80. Kattenberg JH, Fernandez-Miñope C, van Dijk NJ, Llacsahuanga Allcca L, Guetens P, Valdivia HO, Van Geertruyden JP, Rovira-Vallbona E, Monsieurs P, Delgado-Ratto C, Gamboa D, Rosanas-Urgell A. Malaria Molecular Surveillance in the Peruvian Amazon with a Novel Highly Multiplexed Plasmodium falciparum AmpliSeq Assay. *Microbiol Spectr.* 2023 Feb 22;11(2):e0096022.
81. Kattenberg JH, Nguyen HV, Nguyen HL, Sauve E, Nguyen NT, Chopo Pizarro A, et al. Novel highly-multiplexed AmpliSeq targeted assay for Plasmodium vivax genetic surveillance use cases at multiple geographical scales. 2022. DOI: 10.3389/fcimb.2022.953187
82. Keenan K, McGinnity P, Cross TF, Crozier WW, Prodöhl PA. diveRsity: An R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors. *Methods in Ecology and Evolution.* 2013;4(8):782-8.

83. Kheang ST, Lin MA, Lwin S, Naing YH, Yarzar P, Kak N, et al. Malaria Case Detection Among Mobile Populations and Migrant Workers in Myanmar: Comparison of 3 Service Delivery Approaches. *Glob Health Sci Pract.* 2018 Jun 29;6(2):384-389
84. Koepfli C, Mueller I. Malaria Epidemiology at the Clone Level. *Trends Parasitol.* 2017 Dec;33(12):974-985.
85. Labbé F, He Q, Zhan Q, Tiedje KE, Argyropoulos DC, Tan MH, Ghansah A, Day KP, Pascual M. Neutral vs. non-neutral genetic footprints of *Plasmodium falciparum* multiclonal infections. *PLoS Comput Biol.* 2023 Jan 3;19(1):e1010816.
86. Lacerda MVG, Llanos-Cuentas A, Krudsood S, Lon C, Saunders DL, Mohammed R, et al. Single-Dose Tafenoquine to Prevent Relapse of *Plasmodium vivax* Malaria. *N Engl J Med.* 2019 Jan 17;380(3):215-228.
87. Lalremruata A, Nguyen TT, McCall MBB, Mombo-Ngoma G, Agnandji ST, Adegnika AA, et al. Recombinase Polymerase Amplification and Lateral Flow Assay for Ultrasensitive Detection of Low-Density *Plasmodium falciparum* Infection from Controlled Human Malaria Infection Studies and Naturally Acquired Infections. *J Clin Microbiol.* 2020 Apr 23;58(5):e01879-19.
88. Lee RA, Puig H, Nguyen PQ, Angenent-Mari NM, Donghia NM, McGee JP, et al. Ultrasensitive CRISPR-based diagnostic for field-applicable detection of *Plasmodium* species in symptomatic and asymptomatic malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020 Oct 13;117(41):25722-25731.
89. Lee S, Bahlo M. moimix: an R package for assessing clonality in high-throughput sequencing data. moimix: an R package for assessing clonality in high. 2016. URL: <https://zenodo.org/record/58257>

90. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009;25(14):1754-60.
91. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009;25(16):2078-9.
92. Li H. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics*. 2011 Nov 1;27(21):2987-93.
93. López N, Tuesta Diego. Economías ilícitas y orden social: la frontera de Perú, Brasil y Colombia. *Revista CIDOB d' Afers Internacionals*. 2015, 111: 79-104
94. Lerch A, Koepfli C, Hofmann NE, Messerli C, Wilcox S, Kattenberg JH, Betuela I, O'Connor L, Mueller I, Felger I. Development of amplicon deep sequencing markers and data analysis pipeline for genotyping multi-clonal malaria infections. *BMC Genomics*. 2017 Nov 13;18(1):864.
95. Magill AJ, Zegarra J, Garcia C, Marquino W, Ruebush TK, 2nd. Efficacy of sulfadoxine/pyrimethamine and mefloquine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in the Amazon basin of Peru. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2004;37(3):279-81.
96. MalariaGEN; Abdel Hamid MM, Abdelraheem MH, Acheampong DO, Ahouidi A, Ali M, et al.. Pf7: an open dataset of *Plasmodium falciparum* genome variation in 20,000 worldwide samples. *Wellcome Open Res*. 2023 Jan 16;8:22.

97. Maltha J, Gamboa D, Bendezu J, Sanchez L, Cnops L, Gillet P, et al. Rapid diagnostic tests for malaria diagnosis in the Peruvian Amazon: impact of *pfhrp2* gene deletions and cross-reactions. *PLoS One*. 2012;7(8):e43094.
98. Mangold KA, Manson RU, Koay ES, Stephens L, Regner M, Thomson RB Jr, et al. Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium* spp. *J Clin Microbiol*. 2005 May;43(5):2435-40.
99. Manrique P, Miranda-Alban J, Alarcon-Baldeon J, Ramirez R, Carrasco-Escobar G, Herrera H, et al. Microsatellite analysis reveals connectivity among geographically distant transmission zones of *Plasmodium vivax* in the Peruvian Amazon: A critical barrier to regional malaria elimination. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019 Nov 11;13(11):e0007876.
100. Martinelli A, Hunt P, Fawcett R, Cravo PV, Walliker D, Carter R. An AFLP-based genetic linkage map of *Plasmodium chabaudi chabaudi*. *Malar J*. 2005 Feb 11;4:11.
101. Mathieu LC, Cox H, Early AM, Mok S, Lazrek Y, Paquet JC, et al. Local emergence in Amazonia of *Plasmodium falciparum* k13 C580Y mutants associated with in vitro artemisinin resistance. *Elife*. 2020 May 12;9:e51015.
102. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*. 2010 Sep;20(9):1297-303.
103. Meireles BM, de Souza Sampaio V, Monteiro WM, Goncalves MJF. Factors associated with malaria in indigenous populations: A retrospective study from 2007 to 2016. *PLoS One*. 2020;15(10):e0240741.

104. Ministerio de Salud (MINSA). Norma técnica de salud para la atención de la malaria y malaria grave en el Perú. 2015. Disponible en URL: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/4373.pdf>
105. Ministerio de Salud (MINSA). Número de casos de malaria, Perú – Semana Epidemiológica 29 del 2022. 2022a. Disponible en: <https://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/sala/2022/SE29/malaria.pdf>
106. Ministerio de Salud (MINSA). Resolución Ministerial N° 034-2022-MINSA. Plan hacia la eliminación de la Malaria en el Perú 2022-2030. 2022b. Disponible en URL: <https://www.gob.pe/institucion/minsa/normas-legales/2723757-034-2022-minsa>
107. Ministerio de Salud (MINSA). RM No 244-2017/MINSA. Plan Malaria Cero: Período 2017-2021. 2017. Disponible en URL: <https://www.gob.pe/institucion/minsa/normas-legales/189846-244-2017-minsa>
108. Minja DT, Schmiegelow C, Mmbando B, Boström S, Oesterholt M, Magistrado P, Pehrson C, John D, Salanti A, Luty AJ, Lemnge M, Theander T, Lusingu J, Alifrangis M. Plasmodium falciparum mutant haplotype infection during pregnancy associated with reduced birthweight, Tanzania. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(9):1446–54.
109. Montenegro CC, Bustamante-Chauca TP, Pajuelo Reyes C, Bernal M, Gonzales L, Tapia-Limonchi R, Tejedo JR, Chenet SM. Plasmodium falciparum outbreak in native communities of Condorcanqui, Amazonas, Perú. *Malar J.* 2021 Feb 12;20(1):88.

110. Montiel J, Zuluaga LM, Aguirre DC, Segura C, Tobon-Castaño A, Vásquez AM. Microscopic and submicroscopic Plasmodium infections in indigenous and non-indigenous communities in Colombia. *Malar J.* 2020 Apr 16;19(1):157.
111. Moreno-Gutierrez D, Llanos-Cuentas A, Luis Barboza J, Contreras-Mancilla J, Gamboa D, Rodriguez H, Carrasco-Escobar G, Boreux R, Hayette MP, Beutels P, Speybroeck N, Rosas-Aguirre A. Effectiveness of a Malaria Surveillance Strategy Based on Active Case Detection during High Transmission Season in the Peruvian Amazon. *Int J Environ Res Public Health.* 2018 Nov 27;15(12):2670.
112. Moreno-Gutierrez D, Rosas-Aguirre A, Llanos-Cuentas A, Bilcke J, Barboza JL, Hayette MP, et al. Economic costs analysis of uncomplicated malaria case management in the Peruvian Amazon. *Malar J.* 2020 Apr 21;19(1):161.
113. Muiruri P, Juma DW, Ingasia LA, Chebon LJ, Opot B, Ngalah BS, Cheruiyot J, Andagalu B, Akala HM, Nyambati VCS, Ng'ang'a JK, Kamau E. Selective sweeps and genetic lineages of Plasmodium falciparum multi-drug resistance (pfmdr1) gene in Kenya. *Malar J.* 2018 Oct 30;17(1):398.
114. Murmu LK, Sahu AA, Barik TK. Diagnosing the drug resistance signature in Plasmodium falciparum: a review from contemporary methods to novel approaches. *J Parasit Dis.* 2021 Sep;45(3):869-876.
115. Naing C, Whittaker MA, Tanner M. Inter-sectoral approaches for the prevention and control of malaria among the mobile and migrant populations: a scoping review. *Malar J.* 2018 Nov 16;17(1):430.
116. Nateghpour M, Edrissian G, Raeisi A, Motevalli-Haghi A, Farivar L, Mohseni G, Rahimi-Froushani A. The Role of Malaria Microscopy Training and

Refresher Training Courses in Malaria Control Program in Iran during 2001 - 2011. *Iran J Parasitol.* 2012;7(4):104-9.

117. Nolasco O, Montoya J, Rosales Rosas AL, Barrientos S, Rosanas-Urgell A, Gamboa D. Multicopy targets for *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* detection by colorimetric LAMP. *Malar J.* 2021 May 19;20(1):225.

118. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000 Jun 15;28(12):E63.

119. Noviyanti R, Miotto O, Barry A, Marfurt J, Siegel S, Thuy-Nhien N, Quang HH, Anggraeni ND, Laihad F, Liu Y, Sumiwi ME, Trimarsanto H, Coutrier F, Fadila N, Ghanchi N, Johora FT, Puspitasari AM, Tavul L, Trianty L, Utami RAS, Wang D, Wangchuck K, Price RN, Auburn S. Implementing parasite genotyping into national surveillance frameworks: feedback from control programmes and researchers in the Asia-Pacific region. *Malar J.* 2020 Jul 27;19(1):271.

120. Nsanzabana C, Djalle D, Guérin PJ, Ménard D, González IJ. Tools for surveillance of anti-malarial drug resistance: an assessment of the current landscape. *Malar J.* 2018 Feb 8;17(1):75. doi: 10.1186/s12936-018-2185-9.

121. Okoth SA, Chenet SM, Arrospide N, Gutierrez S, Cabezas C, Matta JA, et al. Molecular Investigation into a Malaria Outbreak in Cusco, Peru: *Plasmodium falciparum* BV1 Lineage is Linked to a Second Outbreak in Recent Times. *Am J Trop Med Hyg.* 2016 Jan;94(1):128-31

122. PAMAFRO, Compartiendo lecciones aprendidas. Proyecto control de malaria en zonas fronterizas de la región andina: un enfoque comunitario-PAMAFRO. 2009, Lima, Peru: Organismo Andino de Salud.

123. Paradis E, Schliep K. ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics*. 2019 Feb 1;35(3):526-528.
124. Peakall R, Smouse PE. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. *Bioinformatics*. 2012 Oct 1;28(19):2537-9.
125. Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA. DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biol*. 2006 Jul;4(7):e204.
126. Pillai DR, Hajar G, Montoya Y, Marouinño W, Ruebush TK 2nd, Wongsrichanalai C, et al. Lack of prediction of mefloquine and mefloquine-artesunate treatment outcome by mutations in the Plasmodium falciparum multidrug resistance 1 (pfmdr1) gene for P. falciparum malaria in Peru. *Am J Trop Med Hyg*. 2003 Jan;68(1):107-10
127. Pincelli A, Neves PAR, Lourenço BH, Corder RM, Malta MB, Sampaio-Silva J, de Souza RM, Cardoso MA, Castro MC, Ferreira MU, For The Mina Brazil Working Group. The Hidden Burden of Plasmodium vivax Malaria in Pregnancy in the Amazon: An Observational Study in Northwestern Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2018 Jul;99(1):73-83
128. Price RN, von Seidlein L, Valecha N, Nosten F, Baird JK, White NJ. Global extent of chloroquine-resistant Plasmodium vivax: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2014 Oct;14(10):982-91.
129. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000 Jun 1;155(2):945-59.
130. Quispe Carbajal M. Análisis de la diversidad genética y estructura poblacional de Plasmodium falciparum con deleciones en los genes pfhrp2 y pfhrp3

en tres comunidades de la Amazonía peruana [master's thesis]. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia. 2017.

131. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, et al. Integrative Genomics Viewer. *Nat Biotechnol.* 2011;29:24–26.

132. Robortella DR, Calvet AA, Amaral LC, Fantin RF, Guimaraes LFF, Franca Dias MH, et al. Prospective assessment of malaria infection in a semi-isolated Amazonian indigenous Yanomami community: Transmission heterogeneity and predominance of submicroscopic infection. *PLoS One.* 2020;15(3):e0230643

133. Rogier E, Herman C, Huber CS, Hamre KES, Pierre B, Mace KE, Prémumé J, Mondélus G, Romilus I, Elismé T, Eisele TP, Druetz T, Existe A, Boncy J, Lemoine JF, Udhayakumar V, Chang MA. Nationwide Monitoring for *Plasmodium falciparum* Drug-Resistance Alleles to Chloroquine, Sulfadoxine, and Pyrimethamine, Haiti, 2016-2017. *Emerg Infect Dis.* 2020 May;26(5):902-909.

134. Rosado J, Carrasco-Escobar G, Nolasco O, Garro K, Rodriguez-Ferruci H, Guzman-Guzman M, Llanos-Cuentas A, Vinetz JM, Nekkab N, White MT, Mueller I, Gamboa D. Malaria transmission structure in the Peruvian Amazon through antibody signatures to *Plasmodium vivax*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2022 May 9;16(5):e0010415.

135. Rosas-Aguirre A, Gamboa D, Manrique P, Conn JE, Moreno M, Lescano AG, et al. Epidemiology of *Plasmodium vivax* Malaria in Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 2016 Dec 28;95(6 Suppl):133-144.

136. Rosas-Aguirre A, Guzman-Guzman M, Chuquiyaui R, Moreno M, Manrique P, Ramirez R, et al. Temporal and Microspatial Heterogeneity in Transmission Dynamics of Coendemic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium*

falciparum in Two Rural Cohort Populations in the Peruvian Amazon. *J Infect Dis.* 2021 Apr 23;223(8):1466-1477.

137. Rosas-Aguirre A, Guzman-Guzman M, Gamboa D, Chuquiyauri R, Ramirez R, Manrique P, et al. Micro-heterogeneity of malaria transmission in the Peruvian Amazon: a baseline assessment underlying a population-based cohort study. *Malar J.* 2017 Aug 4;16(1):312.

138. Roth JM, Korevaar DA, Leeflang MM, Mens PF. Molecular malaria diagnostics: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2016;53(2):87-105.

139. Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, Jatton K. Detection of four Plasmodium species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. *J Clin Microbiol.* 2004 Dec;42(12):5636-43.

140. Rovira-Vallbona E, Van Hong N, Kattenberg JH, Huan RM, Binh NTH, Ngoc NTH, Guetens P, Hieu NL, Hien NTT, Sang VT, Long ND, Sauve E, Duong TT, Xa NX, Erhart A, Rosanas-Urgell A. High Proportion of Genome-Wide Homology and Increased Pretreatment pvcrt Levels in Plasmodium vivax Late Recurrences: a Chloroquine Therapeutic Efficacy Study. *Antimicrob Agents Chemother.* 2021 Jul 16;65(8):e0009521.

141. Sanchez JF, Halsey ES, Bayer AM, Beltran M, Razuri HR, Velasquez DE, et al. Needs, acceptability, and value of humanitarian medical assistance in remote Peruvian Amazon riverine communities. *Am J Trop Med Hyg.* 2015 Jun;92(6):1090-9

142. Sato S. Plasmodium-a brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology. *J Physiol Anthropol.* 2021 Jan 7;40(1):1.
143. Schindler T, Deal AC, Fink M, Guirou E, Moser KA, Mwakasungula SM, et al. A multiplex qPCR approach for detection of pfhrp2 and pfhrp3 gene deletions in multiple strain infections of *Plasmodium falciparum*. *Sci Rep.* 2019 Sep 11;9(1):13107.
144. Shen HM, Chen SB, Wang Y, Xu B, Abe EM, Chen JH. Genome-wide scans for the identification of *Plasmodium vivax* genes under positive selection. *Malar J.* 2017 Jun 6;16(1):238.
145. Slatkin M. Linkage disequilibrium--understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nat Rev Genet.* 2008;9(6):477-85
146. Stabler TC, Dwivedi A, Shrestha B, Joshi S, Schindler T, Ouattara A, García GA, Daubenberger C, Silva JC. Gene Coverage Count and Classification (GC3): a locus sequence coverage assessment tool using short-read whole genome sequencing data, and its application to identify and classify histidine-rich protein 2 and 3 deletions in *Plasmodium falciparum*. *Malar J.* 2022 Nov 29;21(1):357.
147. Sutton PL, Neyra V, Hernandez JN, Branch OH. *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections in the Peruvian Amazon: propagation of complex, multiple allele-type infections without super-infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2009 Dec;81(6):950-60.
148. Sutton PL, Torres LP, Branch OH. Sexual recombination is a signature of a persisting malaria epidemic in Peru. *Malar J.* 2011 Oct 31;10:329.

149. Suwanarusk R, Chavchich M, Russell B, Jaidee A, Chalfein F, Barends M, et al. Amplification of *pvm-dr1* associated with multidrug-resistant *Plasmodium vivax*. *J Infect Dis*. 2008 Nov 15;198(10):1558-64.
150. Tan KR, Hwang J. Tafenoquine receives regulatory approval in USA for prophylaxis of malaria and radical cure of *Plasmodium vivax*. *J Travel Med*, 2018. 25(1).
151. Taylor AR, Echeverry DF, Anderson TJC, Neafsey DE, Buckee CO. Identity-by-descent with uncertainty characterises connectivity of *Plasmodium falciparum* populations on the Colombian-Pacific coast. *PLoS Genet*. 2020 Nov 16;16(11):e1009101.
152. Taylor AR, Jacob PE, Neafsey DE, Buckee CO. Estimating Relatedness Between Malaria Parasites. *Genetics*. 2019 Aug;212(4):1337-1351. doi: 10.1534/genetics.119.302120.
153. Taylor AR, Schaffner SF, Cerqueira GC, Nkhoma SC, Anderson TJC, Sriprawat K, Pyae Phy A, Nosten F, Neafsey DE, Buckee CO. Quantifying connectivity between local *Plasmodium falciparum* malaria parasite populations using identity by descent. *PLoS Genet*. 2017 Oct 27;13(10):e1007065.
154. Tereba A, Konecka A. Comparison of Microsatellites and SNP Markers in Genetic Diversity Level of Two Scots Pine Stands. *Environmental Sciences Proceedings*. 2021; 3(1):4.
155. Thomson-Luque R, Bautista JM. Home Sweet Home: *Plasmodium vivax*-Infected Reticulocytes-The Younger the Better? *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 May 13;11:675156.

156. Torres K, Alava F, Soto-Calle V, Llanos-Cuentas A, Rodriguez H, Llacsahuanga L, et al Malaria Situation in the Peruvian Amazon during the COVID-19 Pandemic. *Am J Trop Med Hyg.* 2020 Nov;103(5):1773-1776.
157. Valdivia HO, Anderson K, Smith D, Pasay C, Salas CJ, Braga G, et al. Spatiotemporal dynamics of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 and 3 deletions in Peru. *Sci Rep.* 2022 Nov 18;12(1):19845.
158. Van den Eede P, Van der Auwera G, Delgado C, Huyse T, Soto-Calle VE, Gamboa D, et al. Multilocus genotyping reveals high heterogeneity and strong local population structure of the *Plasmodium vivax* population in the Peruvian Amazon. *Malar J.* 2010 Jun 3;9:151.
159. Veiga MI, Dhingra SK, Henrich PP, Straimer J, Gnadig N, Uhlemann AC, et al. Globally prevalent PfMDR1 mutations modulate *Plasmodium falciparum* susceptibility to artemisinin-based combination therapies. *Nat Commun.* 2016;7:11553.
160. Vieira ML, Santini L, Diniz AL, Munhoz Cde F. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genet Mol Biol.* 2016 Jul-Sep;39(3):312-28.
161. Vieira PP, Ferreira MU, Alecrim Md, Alecrim WD, da Silva LH, Sihuinchá MM, et al. pfcrt Polymorphism and the spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* populations across the Amazon Basin. *J Infect Dis.* 2004 Jul 15;190(2):417-24.
162. Villasis E, Garro K, Rosas-Aguirre A, Rodriguez P, Rosado J, Gave A, et al. PvMSP8 as a Novel *Plasmodium vivax* Malaria Sero-Marker for the Peruvian Amazon. *Pathogens.* 2021 Mar 2;10(3):282.

163. Villena FE, Maguiña JL, Santolalla ML, Pozo E, Salas CJ, Ampuero JS, et al. Molecular surveillance of the Plasmodium vivax multidrug resistance 1 gene in Peru between 2006 and 2015. *Malar J.* 2020 Dec 4;19(1):450.
164. Villena FE, Sanchez JF, Nolasco O, Braga G, Ricopa L, Barazorda K, et al. Drug resistance and population structure of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax in the Peruvian Amazon. *Sci Rep.* 2022 Oct 1;12(1):16474.
165. Weir BS, Cockerham CC. ESTIMATING F-STATISTICS FOR THE ANALYSIS OF POPULATION STRUCTURE. *Evolution.* 1984 Nov;38(6):1358-1370.
166. Wohl S, Lee EC, DiPrete BL, Lessler J. Sample size calculations for pathogen variant surveillance in the presence of biological and systematic biases. *Cell Rep Med.* 2023 May 16;4(5):101022.
167. World Health Organization (WHO). Global vector control response 2017-2030. 2017. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/259205>
168. World Health Organization (WHO). Malaria surveillance, monitoring & evaluation: a reference manual. 2018. Disponible en URL: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272284/9789241565578-eng.pdf>
169. World Health Organization (WHO). Strategy to respond to antimalarial drug resistance in Africa. 2022. https://cdn.who.int/media/docs/default-source/malaria/who-antimalarial-drug-resistance-strategy-for-consultation.pdf?sfvrsn=9d4eaa0_6
170. Zhou Z, Griffing SM, de Oliveira AM, McCollum AM, Quezada WM, Arrospide N, et al. Decline in sulfadoxine-pyrimethamine-resistant alleles after

change in drug policy in the Amazon region of Peru. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Feb;52(2):739-41.

XII. ANEXOS

Tabla S1. Proporción de infecciones policlonales por grupos. Las estadísticas de Fws se utilizaron como indicador de la complejidad de las infecciones. Todas las variantes fueron consideradas para el cálculo.

<i>P. vivax</i>		<i>P. falciparum</i>	
Grupo	n/N (%)	Grupo	n/N (%)
NJ ACD 1 - 2019	12/13 (92.3 %)	NJ ACD Nov 2019	1/7 (14.3%)
NJ ACD 2 - 2019	15/19 (78.9 %)	NJ PCD Dic 2019	2/7 (28.6 %)
NJ ACD 3 - 2019	13/16 (81.3 %)	NJ PCD Feb 2020	17/29 (58.6 %)
NJ PCD - 2020	18/20 (90 %)	NJ PCD Mar 2020	0/9 (0 %)
Mazán - 2018	13/13 (100 %)	NJ PCD Abr-May 2020	0/6 (0 %)
Yavarí - 2018	3/20 (15 %)	Mazán 2018	0/9 (0 %)
Total	74/101 (73.3 %)	Santa Emilia 2016	1/12 (8.3 %)
		Andoas 2018	0/4 (0 %)
		Total	21/83 (25.3%)

Tabla S2. Lista de SNPs críticos en muestras de *P. vivax*

SNP	Cromosoma	Posición	Locus	Observaciones
PvP01_01_v1_442409	PvP01_01_v1	442409	pvcrt	intron variant of pvcrt
PvP01_01_v1_443689	PvP01_01_v1	443689	pvcrt	intron variant of pvcrt
PvP01_01_v1_642154	PvP01_01_v1	642154	PvP01_01_v1_642154	Peru SNP Ile1478Val in pvmrp1 (missense) Lys36Gln in pvmrp1 (missense)
PvP01_02_v1_154492	PvP01_02_v1	154492	pvmrp1	
PvP01_02_v1_158818	PvP01_02_v1	158818	pvmrp1	
PvP01_02_v1_560622	PvP01_02_v1	560622	PvP01_02_v1_560561	in Peru SNP amplicon
PvP01_02_v1_560678	PvP01_02_v1	560678	PvP01_02_v1_560561	in Peru SNP amplicon upstream variant of pvdmt2
PvP01_03_v1_552844	PvP01_03_v1	552844	pvdmt2	Ser277Tyr in pvdmt2 (missense)
PvP01_03_v1_553678	PvP01_03_v1	553678	pvdmt2	
PvP01_03_v1_556498	PvP01_03_v1	556498	PvP01_03_v1_556656	in Peru SNP amplicon
PvP01_04_v1_760792	PvP01_04_v1	760792	PvP01_04_v1_760567	in Peru SNP amplicon
PvP01_06_v1_448117	PvP01_06_v1	448117	PvP01_06_v1_448117	Peru SNP
PvP01_08_v1_1584557	PvP01_08_v1	1584557	PvP01_08_v1_1584557	Peru SNP
PvP01_08_v1_203155	PvP01_08_v1	203155	PvP01_08_v1_203155	Peru SNP
PvP01_10_v1_569233	PvP01_10_v1	569233	PvP01_10_v1_569233	Peru SNP insertion in pvp13k (disruptive_inframe) insertion OR deletion in pvp13k
PvP01_10_v1_828985	PvP01_10_v1	828985	pvp13k	
PvP01_10_v1_831222	PvP01_10_v1	831222	pvp13k	(conservative_inframe) upstream variant of ABCE1
PvP01_11_v1_159978	PvP01_11_v1	159978	ABCE1	intronic variant of ABCE1
PvP01_11_v1_161909	PvP01_11_v1	161909	ABCE1	
PvP01_11_v1_251753	PvP01_11_v1	251753	PvP01_11_v1_251753	Peru SNP Ser303Ser in pvmdr2 (synonymous) Gly304Gly in pvmdr2 (synonymous) Gly305Ser in pvmdr2 (missense) Asp1447Glu in pvmdr2 (missense) Ala1450Val in pvmdr2 (missense) Thr1480Ala in pvmdr2 (missense) Thr1480Thr in pvmdr2 (synonymous)
PvP01_12_v1_2442390	PvP01_12_v1	2442390	pvmdr2	
PvP01_12_v1_2442393	PvP01_12_v1	2442393	pvmdr2	
PvP01_12_v1_2442394	PvP01_12_v1	2442394	pvmdr2	
PvP01_12_v1_2445822	PvP01_12_v1	2445822	pvmdr2	
PvP01_12_v1_2445830	PvP01_12_v1	2445830	pvmdr2	
PvP01_12_v1_2445919	PvP01_12_v1	2445919	pvmdr2	
PvP01_12_v1_2445921	PvP01_12_v1	2445921	pvmdr2	
PvP01_12_v1_381435	PvP01_12_v1	381435	PvP01_12_v1_381435	Peru SNP
PvP01_13_v1_1351644	PvP01_13_v1	1351644	PvP01_13_v1_1351644	Peru SNP

PvP01_13_v1_66064	PvP01_13_v1	66064	PVP01_1301600	Asp1181Asp in PVP01_1301600 (synonymous)
PvP01_13_v1_66064	PvP01_13_v1	66064	PVP01_1301600	Asp1181Asp in PVP01_1301600 (synonymous)
PvP01_13_v1_66115	PvP01_13_v1	66115	PVP01_1301600	Glu1198Glu in PVP01_1301600 (synonymous)
PvP01_13_v1_66121	PvP01_13_v1	66121	PVP01_1301600	Ile1200Ile in PVP01_1301600 (synonymous)
PvP01_14_v1_1270124	PvP01_14_v1	1270124	pvdhps	large ins or del in pvdhps
PvP01_14_v1_1385718	PvP01_14_v1	1385718	PvP01_14_v1_1385718	Peru SNP
PvP01_14_v1_2053904	PvP01_14_v1	2053904	pvmrp2	Glu1407Gln in pvmrp2 (missense)
PvP01_14_v1_2054372	PvP01_14_v1	2054372	pvmrp2	Asn1251Tyr in pvmrp2 (missense)

Tabla S3. Lista de SNPs críticos en muestras de *P. falciparum*

SNP	Cromosoma	Posición	Locus	Observaciones
Pf3D7_12_v3_1611243	Pf3D7_12_v3	1611243	acyl-CoA synthetase	Asn305dup
Pf3D7_12_v3_718433	Pf3D7_12_v3	718433	AP-2 complex subunit mu	Ser160Asn
Pf3D7_11_v3_1294700	Pf3D7_11_v3	1294700	apical membrane antigen 1	Ile282Lys
Pf3D7_11_v3_1294777	Pf3D7_11_v3	1294777	apical membrane antigen 1	Gln308Glu
Pf3D7_11_v3_1294850	Pf3D7_11_v3	1294850	apical membrane antigen 1	Ile332Asn
Pf3D7_11_v3_1295068	Pf3D7_11_v3	1295068	apical membrane antigen 1	Glu405Lys
Pf3D7_11_v3_1295170	Pf3D7_11_v3	1295170	apical membrane antigen 1	Asn439His
Pf3D7_11_v3_1295197	Pf3D7_11_v3	1295197	apical membrane antigen 1	Asp448Asn
Pf3D7_11_v3_1294529	Pf3D7_11_v3	1294529	apical membrane antigen 1	Ile225Asn -2234_-
Pf3D7_07_v3_405980	Pf3D7_07_v3	405980	Cg1 protein	2221delTTTTTTTTTTTTTTTT
Pf3D7_07_v3_405893	Pf3D7_07_v3	405893	Cg1 protein	-2322_-2321insTTT
Pf3D7_12_v3_2093692	Pf3D7_12_v3	2093692	coronin	Val424Ile
Pf3D7_04_v3_748235	Pf3D7_04_v3	748235	DHFR-TS	Cys50Arg
Pf3D7_05_v3_962174	Pf3D7_05_v3	962174	heptatricopeptide repeat-containing protein	-3948_-3947delAT
Pf3D7_13_v3_2841129	Pf3D7_13_v3	2841129	histidine-rich protein III	Ala138_His142dup
Pf3D7_13_v3_2841363	Pf3D7_13_v3	2841363	histidine-rich protein III	Asp65fs
Pf3D7_13_v3_2841367	Pf3D7_13_v3	2841367	histidine-rich protein III	Val63Ala
Pf3D7_13_v3_2841273	Pf3D7_13_v3	2841273	histidine-rich protein III	His94del
Pf3D7_13_v3_2841550	Pf3D7_13_v3	2841550	histidine-rich protein III	-4217A>G
Pf3D7_08_v3_1374168	Pf3D7_08_v3	1374168	PF3D7_0831750	*1449delT
Pf3D7_09_v3_231026	Pf3D7_09_v3	231026	PF3D7_0904900	Ser602Ser
Pf3D7_09_v3_231065	Pf3D7_09_v3	231065	PF3D7_0904900	Lys589Asn
Pf3D7_10_v3_1172712	Pf3D7_10_v3	1172712	PF3D7_1028500	Leu645Pro
Pf3D7_10_v3_1172648	Pf3D7_10_v3	1172648	PF3D7_1028500	Asn663dup
Pf3D7_12_v3_717826	Pf3D7_12_v3	717826	PF3D7_1218200.1	-2162delA
Pf3D7_12_v3_1552142	Pf3D7_12_v3	1552142	PF3D7_1237200.1	Glu607Lys
Pf3D7_13_v3_2505550	Pf3D7_13_v3	2505550	PF3D7_1362600.1	-598_-597insT
Pf3D7_14_v3_832594	Pf3D7_14_v3	832594	PF3D7_1420100.1	Asp1364Gly

Pf3D7_14_v3_294796	Pf3D7_14_v3	294796	plasmepsin II	Gln442His
Pf3D7_14_v3_293397	Pf3D7_14_v3	293397	plasmepsin II	-73_-68delATATAT
Pf3D7_07_v3_403432	Pf3D7_07_v3	403432	protein SCO1 RNA-binding	-3190_-3189insGCT
Pf3D7_11_v3_416316	Pf3D7_11_v3	416316	protein RNA-binding	Asn405fs
Pf3D7_11_v3_416314	Pf3D7_11_v3	416314	protein	Asn414dup
Pf3D7_08_v3_501042	Pf3D7_08_v3	501042	RUVB1	Glu176Glu
Pf3D7_08_v3_501054	Pf3D7_08_v3	501054	RUVB1	Val172Val
Pf3D7_01_v3_190862	Pf3D7_01_v3	190862	ubiquitin carboxyl- terminal hydrolase 1	Asn203_Asn208del
Pf3D7_01_v3_196011	Pf3D7_01_v3	196011	ubiquitin carboxyl- terminal hydrolase 1	Glu1915Lys
Pf3D7_01_v3_196010	Pf3D7_01_v3	196010	ubiquitin carboxyl- terminal hydrolase 1	Glu1915fs
Pf3D7_01_v3_192598	Pf3D7_01_v3	192598	ubiquitin carboxyl- terminal hydrolase 1	Asp777Gly

Tabla S4. Frecuencias de mutaciones y haplotipos en marcadores moleculares asociados a resistencia en muestras de *P. falciparum* según distrito y año. SD: sin determinar.

	NJ 2019	NJ 2020	Mazán 2018	Santa Emilia 2016	Andoas 2018	Total
	(n = 14)	(n = 44)	(n = 9)	(n = 12)	(n = 4)	(n = 83)
<i>pfdhfr</i>						
C50R						
C50R	13 (76.5%)	26 (59.1%)	9 (100%)	12 (100%)	4 (100%)	64 (77.1%)
Mixto	1 (5.9%)	17 (38.6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	18 (21.7%)
C50 - wt	0 (0%)	1 (2.3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1.2%)
N51I						
N51I	14 (100%)	26 (63.6%)	9 (100%)	12 (100%)	4 (100%)	65 (78.3%)
Mixto	0 (0%)	17 (38.6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	17 (20.5%)
wt	0 (0%)	1 (2.3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1.2%)
C59R						
C59 - wt	14 (100%)	44 (100%)	9 (100%)	12 (100%)	4 (100%)	83 (100%)
S108N						
S108N	14 (100%)	44 (100%)	9 (100%)	12 (100%)	4 (100%)	83 (100%)
I164L						
I164 - wt	14 (100%)	44 (100%)	9 (100%)	12 (100%)	4 (100%)	83 (100%)
Haplotipo						
RICNI	13 (92.8%)	26 (59.1%)	9 (100%)	12 (100%)	4 (100%)	64 (77.1%)
CNCNI	0 (0%)	1 (2.3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1.4%)
Mixto	1 (7.1%)	17 (38.6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	18 (21.7%)
<i>pfdhps</i>						
S436A						
S436 - wt	14 (100%)	44 (100%)	9 (100%)	11 (91.7%)	4 (100%)	83 (100%)
SD	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (8.3%)	0 (0%)	1 (1.2%)
A437G						
A437G	8 (64.3%)	17 (38.6%)	9 (100%)	11 (91.7%)	2 (50%)	47 (56.6%)
A437 - wt	3 (21.4%)	15 (34.1%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (50%)	20 (24.1%)
Mixto	3 (21.4%)	12 (27.3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	15 (18.1%)
SD	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (8.3%)	0 (0%)	1 (1.2%)
K540E						
K540E	6 (42.8%)	14 (31.8%)	5 (55.6%)	12 (100%)	2 (50%)	39 (47 %)
wt	4 (28.6%)	20 (45.5%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (50%)	26 (31.3%)
Mixto	3 (21.4%)	7 (15.9%)	1 (11.1%)	0 (0%)	0 (0%)	11 (13.3%)
SD	1 (7.1%)	3 (6.8%)	3 (33.3%)	0 (0%)	0 (0%)	7 (8.4%)
A581G						
A581G	7 (50%)	17 (38.6%)	8 (88.9%)	12 (100%)	2 (50%)	46 (55.4%)

A581 - wt	4 (28.6%)	18 (40.9%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (50%)	24 (28.9%)
Mixto	3 (21.4%)	9 (20.5%)	1 (11.1%)	0 (0%)	0 (0%)	13 (15.7%)
A613S						
A613 - wt	14 (100%)	44 (100%)	9 (100%)	12 (100%)	4 (100%)	83 (100%)
Haplotipo						
SGEGA	6 (42.8%)	14 (31.8%)	5 (5.6%)	11 (91.7%)	2 (50%)	38 (45.8%)
SAKAA	3 (21.4%)	15 (34.1%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (50%)	20 (24.1%)
Mixto	4 (28.6%)	12 (27.3%)	1 (11.1%)	0 (0%)	0 (0%)	17 (20.5%)
Incompleto	1 (7.1%)	3 (6.8%)	3 (44.4%)	1 (8.3%)	0 (0%)	8 (9.6%)
<hr/>						
<i>pfmdr1</i>						
N86Y						
N86 - wt	14 (100%)	44 (100%)	9 (100%)	12 (100%)	4 (100%)	83 (100%)
D144G						
D144 - wt	14 (100%)	44 (100%)	9 (100%)	12 (100%)	4 (100%)	83 (100%)
Y184F						
Y184F	11 (78.6%)	42 (95.5%)	8 (88.9%)	12 (100%)	4 (100%)	77 (92.8%)
SD	3 (21.4%)	2 (4.5%)	1 (11.1%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (7.2%)
S1034C						
S1034C	14 (100%)	44 (100%)	9 (100%)	12 (100%)	4 (100%)	83 (100%)
N1042D						
N1042D	14 (100%)	43 (97.7%)	8 (88.9%)	11 (91.7%)	4 (100%)	80 (96.4%)
Mixto	0 (0%)	1 (2.3%)	1 (11.1%)	1 (8.3%)	0 (0%)	3 (3.6%)
D1246Y						
D1246Y	14 (100%)	44 (100%)	9 (100%)	12 (100%)	4 (100%)	83 (100%)
Haplotipo						
NDFDY	11 (78.6%)	41 (93.2%)	7 (77.8%)	11 (91.7%)	4 (100%)	74 (89.2%)
Mixto	0 (0%)	1 (2.3%)	1 (11.1%)	1 (8.3%)	0 (0%)	3 (3.6%)
Incompleto	3 (21.4%)	2 (14.3%)	1 (11.1%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (7.2%)
<hr/>						
<i>pfert</i>						
C72S						
C72S	6 (42.6%)	27 (61.4%)	6 (66.7%)	12 (100%)	3 (75%)	54 (65.1%)
SD	8 (57.4%)	17 (38.6%)	3 (33.3%)	0 (0%)	1 (25%)	29 (34.9%)
V73						
wt	6 (42.6%)	27 (61.4%)	6 (66.7%)	12 (100%)	3 (75%)	54 (65.1%)
SD	8 (57.4%)	17 (38.6%)	3 (33.3%)	0 (0%)	1 (25%)	29 (34.9%)
M74I						
wt	6 (42.6%)	27 (61.4%)	6 (66.7%)	12 (100%)	3 (75%)	54 (65.1%)
SD	8 (57.4%)	17 (38.6%)	3 (33.3%)	0 (0%)	1 (25%)	29 (34.9%)
N75D						
wt	6 (42.6%)	27 (61.4%)	6 (66.7%)	12 (100%)	3 (75%)	54 (65.1%)
SD	8 (57.4%)	17 (38.6%)	3 (33.3%)	0 (0%)	1 (25%)	29 (34.9%)
K76T						

K76T	6 (42.6%)	27 (61.4%)	6 (66.7%)	12 (100%)	3 (75%)	54 (65.1%)
SD	8 (57.4%)	17 (38.6%)	3 (33.3%)	0 (0%)	1 (25%)	29 (34.9%)
I356V						
I356V	6 (42.6%)	27 (61.4%)	6 (66.7%)	12 (100%)	3 (75%)	54 (65.1%)
SD	8 (57.4%)	17 (38.6%)	3 (33.3%)	0 (0%)	1 (25%)	29 (34.9%)
Haplotipo						
SVMNT	6 (42.6%)	27 (61.4%)	6 (66.7%)	12 (100%)	3 (75%)	54 (65.1%)
SD	8 (57.4%)	17 (38.6%)	3 (33.3%)	0 (0%)	1 (25%)	29 (34.9%)
<hr/>						
<i>pfk13</i>						
K189T						
K189 - wt	6 (42.8%)	18 (40.9%)	1 (11.1%)	9 (75%)	0 (0%)	34 (41%)
K189T	5 (35.7%)	26 (59.1%)	8 (88.9%)	2 (16.7%)	4 (100%)	45 (54.2%)
Mixto	2 (14.3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (2.4%)
SD	1 (7.1%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (8.3%)	0 (0%)	2 (2.4%)
V445A						
V445 - wt	14 (100%)	44 (100%)	9 (100%)	12 (100%)	4 (100%)	83 (100%)
R539T						
R539 - wt	14 (100%)	44 (100%)	9 (100%)	12 (100%)	4 (100%)	83 (100%)
I543T						
I543 - wt	14 (100%)	44 (100%)	9 (100%)	12 (100%)	4 (100%)	83 (100%)
C580Y						
C580 - wt	13 (92.9%)	43 (97.7%)	9 (100%)	12 (100%)	4 (100%)	81 (97.6%)
SD	1 (7.1%)	1 (2.3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (2.4%)
V581I						
V581 - wt	13 (92.9%)	43 (97.7%)	9 (100%)	12 (100%)	4 (100%)	81 (97.6%)
SD	1 (7.1%)	1 (2.3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (2.4%)
<hr/>						
Coronin						
V62M						
V62 - wt	13 (92.9%)	31 (70.5%)	9 (100%)	12 (100%)	4 (100%)	69 (83.1%)
V62M	1 (7.1%)	1 (2.3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (2.4%)
Mixto	0 (0%)	12 (27.3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	12 (14.5%)
V424I						
V424 - wt	8 (52.9%)	25 (55.3%)	1 (11.1%)	11 (91.7%)	3 (75%)	50 (55.6%)
V424I	5 (35.3%)	19 (40.4%)	8 (88.9%)	1 (8.3%)	1 (25%)	35 (38.9%)
Mixto	1 (11.8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (4.4%)
<hr/>						
<i>ubp1</i>						
Haplotipo						
R1133S + E1011K	7 (50%)	18 (40.9%)	0 (0%)	6 (50%)	0 (0%)	31 (37.3%)
Q107L y/o K1193T	3 (21.4%)	25 (56.8%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (50%)	30 (36.1%)

R1133S + E1011K + K764N + K774N	0 (0%)	1 (2.3%)	8 (88.9%)	4 (33.3%)	2 (50%)	15 (18.1%)
Mixto	1(7.1%)	0 (0%)	1 (11.1%)	1 (8.3%)	0 (0%)	3 (3.6%)
Incompleto	3 (2.1%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (8.3%)	0 (0%)	4 (4.8%)

Tabla S5. Frecuencias de mutaciones y haplotipos en marcadores moleculares asociados a resistencia en muestras de *P. falciparum* en Nueva Jerusalén. Las muestras se clasificaron de acuerdo a los grupos indicados en la Fig. 3. SD: sin determinar.

	Nov-19 (n = 7)	Dec 2020 (n = 7)	Feb-20 (n = 29)	Mar-20 (n = 9)	Abr-May 2020 (n = 6)	Total (n = 58)
<i>pfdhfr</i>						
C50R						
C50R	6 (85.7%)	7 (100%)	11 (37.9%)	9 (100%)	6 (100%)	39 (67.2%)
Mixto	1 (14.3%)	0 (0%)	17 (58.6%)	0 (0%)	0 (0%)	18 (31.1%)
C50 - wt	0 (0%)	0 (0%)	1 (3.4%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1.7%)
N51I						
N51I	7 (100%)	7 (100%)	11 (37.9%)	9 (100%)	6 (100%)	40 (69%)
Mixto	0 (0%)	0 (0%)	17 (58.6%)	0 (0%)	0 (0%)	17 (20.5%)
N51 - wt	0 (0%)	0 (0%)	1 (3.2%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1.7%)
C59R						
C59 - wt	7 (100%)	7 (100%)	29 (100%)	9 (100%)	6 (100%)	58 (100%)
S108N						
S108N	7 (100%)	7 (100%)	29 (100%)	9 (100%)	6 (100%)	58 (100%)
I164L						
I164 - wt	7 (100%)	7 (100%)	29 (100%)	9 (100%)	6 (100%)	58 (100%)
Haplotipo						
RICNI	6 (85.7%)	7 (100%)	11 (37.9%)	9 (100%)	6 (100%)	39 (67.2%)
CNCNI	0 (0%)	0 (0%)	1 (3.4%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1.7%)
Mixto	1 (14.3%)	0 (0%)	17 (58.6%)	0 (0%)	0 (0%)	18 (31.1%)
<i>pfdhps</i>						
S436A						
S436 - wt	7 (100%)	7 (100%)	29 (100%)	9 (100%)	6 (100%)	58 (100%)
A437G						
A437G	3 (42.9%)	5 (71.4%)	5 (17.2%)	8 (88.9%)	4 (66.7%)	25 (43.1%)
A437 - wt	2 (28.6%)	1 (14.3%)	12 (41.4%)	1 (11.1%)	2 (33.3%)	18 (31%)
Mixto	2 (28.6%)	1 (14.3%)	12 (41.4%)	0 (0%)	0 (0%)	15 (25.9%)
K540E						
K540E	2 (28.6%)	4 (57.1%)	4 (13.8%)	6 (66.7%)	4 (66.7%)	20 (34.5%)
K450 - wt	3 (42.9%)	1 (14.3%)	17 (58.6%)	1 (11.1%)	2 (33.3%)	24 (41.4%)
Mixto	1 (14.3%)	2 (28.6%)	7 (24.1%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (17.2%)
SD	1 (28.6%)	0 (0%)	1 (3.4%)	2 (22.2%)	0 (0%)	4 (6.9%)
A581G						
A581G	3 (42.9%)	4 (57.1%)	5 (17.2%)	8 (88.9%)	4 (66.7%)	24 (41.4%)
A581 - wt	3 (42.9%)	1 (14.3%)	15 (51.7%)	1 (11.1%)	2 (33.3%)	22 (37.9%)

Mixto	1 (14.3%)	2 (28.6%)	9 (31%)	0 (0%)	0 (0%)	12 (20.7%)
A613S						
A613 - wt	7 (100%)	7 (100%)	29 (100%)	9 (100%)	6 (100%)	58 (100%)
Haplotipo						
SGEGA	2 (28.6%)	4 (57.1%)	4 (13.8%)	6 (66.7%)	4 (66.7%)	20 (34.5%)
SAKAA	2 (28.6%)	1 (14.3%)	12 (41.4%)	1 (11.1%)	2 (33.3%)	18 (31%)
Mixto	2 (28.6%)	2 (28.6%)	12 (41.4%)	0 (0%)	0 (0%)	16 (27.6%)
Incompleto	1 (14.3%)	0 (0%)	1 (3.4%)	2 (22.2%)	0 (0%)	4 (6.9%)
<hr/>						
<i>pfmdr1</i>						
N86Y						
N86 - wt	7 (100%)	7 (100%)	29 (100%)	9 (100%)	6 (100%)	58 (100%)
D144G						
D144 - wt	7 (100%)	7 (100%)	29 (100%)	9 (100%)	6 (100%)	58 (100%)
Y184F						
Y184F	6 (85.7%)	5 (71.4%)	27 (93.1%)	9 (100%)	6 (100%)	53 (91.4%)
SD	1 (14.3%)	2 (28.6%)	2 (6.9%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (8.6%)
S1034C						
S1034C	7 (100%)	7 (100%)	29 (100%)	9 (100%)	6 (100%)	58 (100%)
N1042D						
N1042D	7 (100%)	7 (100%)	28 (96.6%)	9 (100%)	6 (100%)	57 (98.3%)
Mixto	0 (0%)	0 (0%)	1 (3.4%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1.7%)
D1246Y						
D1246Y	7 (100%)	7 (100%)	29 (100%)	9 (100%)	6 (100%)	58 (100%)
Haplotipo						
NDFDY	6 (85.7%)	5 (71.4%)	26 (89.7%)	9 (100%)	6 (100%)	52 (89.7%)
Mixto	0 (0%)	0 (0%)	1 (3.4%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1.7%)
Incompleto	1 (14.3%)	2 (28.6%)	2 (6.9%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (8.6%)
<hr/>						
<i>pfprt</i>						
C72S						
C72S	3 (42.9%)	3 (42.9%)	15 (51.7%)	8 (88.9%)	4 (66.7%)	33 (56.9%)
SD	4 (57.1%)	4 (57.1%)	14 (48.3%)	1 (11.1%)	2 (33.3%)	25 (43.1%)
V73						
V73 - wt	3 (42.9%)	3 (42.9%)	15 (51.7%)	8 (88.9%)	4 (66.7%)	33 (56.9%)
SD	4 (57.1%)	4 (57.1%)	14 (48.3%)	1 (11.1%)	2 (33.3%)	25 (43.1%)
M74I						
M47 - wt	3 (42.9%)	3 (42.9%)	15 (51.7%)	8 (88.9%)	4 (66.7%)	33 (56.9%)
SD	4 (57.1%)	4 (57.1%)	14 (48.3%)	1 (11.1%)	2 (33.3%)	25 (43.1%)
N75D						
N75 - wt	3 (42.9%)	3 (42.9%)	15 (51.7%)	8 (88.9%)	4 (66.7%)	33 (56.9%)
SD	4 (57.1%)	4 (57.1%)	14 (48.3%)	1 (11.1%)	2 (33.3%)	25 (43.1%)
K76T						
K76T	3 (42.9%)	3 (42.9%)	15 (51.7%)	8 (88.9%)	4 (66.7%)	33 (56.9%)

SD	4 (57.1%)	4 (57.1%)	14 (48.3%)	1 (11.1%)	2 (33.3%)	25 (43.1%)
Haplotipo						
SVMNT	3 (42.9%)	3 (42.9%)	15 (51.7%)	8 (88.9%)	4 (66.7%)	33 (56.9%)
SD	4 (57.1%)	4 (57.1%)	14 (48.3%)	1 (11.1%)	2 (33.3%)	25 (43.1%)
<hr/>						
<i>pfk13</i>						
K189T						
K189 - wt	2 (28.6%)	4 (57.1 %)	5 (17.2%)	8 (88.9%)	5 (83.3%)	24 (41.4%)
K189T	3 (42.9%)	2 (28.6%)	24 (82.8%)	1 (11.1%)	1 (16.7%)	31 (53.4%)
Mixto	1 (14.3%)	1 (14.3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (3.4%)
SD	1 (14.3%)	0 (0%)	1 (3.4%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1.7%)
V445A						
V445 - wt	7 (100%)	7 (100%)	29 (100%)	9 (100%)	6 (100%)	58 (100%)
R539T						
R539 - wt	7 (100%)	7 (100%)	29 (100%)	9 (100%)	6 (100%)	58 (100%)
I543T						
I543 - wt	7 (100%)	7 (100%)	29 (100%)	9 (100%)	6 (100%)	58 (100%)
C580Y						
C580 - wt	7 (100%)	6 (85.7%)	28 (96.6%)	9 (100%)	6 (100%)	56 (96.6%)
SD	0 (0%)	1 (14.3%)	1 (3.4%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (3.4%)
V581I						
V581 - wt	7 (100%)	6 (85.7%)	28 (96.6%)	9 (100%)	6 (100%)	56 (96.6%)
SD	0 (0%)	1 (14.3%)	1 (3.4%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (3.4%)
<hr/>						
Coronin						
V62M						
V62 - wt	7 (100%)	6 (85.7%)	16 (55.2%)	9 (100%)	6 (100%)	44 (75.9%)
V62M	0 (0%)	1 (14.3%)	1 (3.4%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (3.4%)
Mixto	0 (0%)	0 (0%)	12 (41.4%)	0 (0%)	0 (0%)	12 (20.7%)
V424I						
V424 - wt	3 (42.9%)	5 (71.4%)	24 (82.8%)	0 (0%)	1 (16.7%)	33 (56.9%)
V424I	3 (42.9%)	2 (28.6%)	5 (17.2%)	9 (100%)	5 (83.3%)	24 (41.4%)
Mixto	1 (14.3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1.7%)
<hr/>						
<i>ubp1</i>						
Haplotipo						
R1133S + E1011K	3 (42.9%)	4 (57.1%)	6 (20.7%)	8 (88.9%)	4 (66.7%)	25 (43.1%)
Q107L y/o K1193T	1 (14.3%)	2 (28.6%)	23 (79.3%)	1 (11.1%)	1 (16.7%)	28 (48.3%)
R1133S + E1011K + K764N + K774N	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (16.7%)	1 (1.7%)
Incompleto	2 (28.6%)	1 (14.3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (5.2%)

Mixto 1 (14.3%) 0 (0%) 0 (0%) 0 (0%) 0 (0%) 1 (1.7%)

Tabla S6. Frecuencias de mutaciones y haplotipos en marcadores moleculares potencialmente asociados a resistencia en muestras de *P. vivax* según localidad y año.
SD: sin determinar.

	NJ 2019 (n = 48)	NJ 2020 (n = 20)	Mazán 2018 (n = 13)	Yavarí 2018 (n = 20)	Total (n = 101)
<i>pvdhfr</i>					
F57L/I					
F57 - wt	48 (100%)	20 (100%)	13 (100%)	20 (100%)	101 (100%)
S58R/K					
S58R	41 (85.4%)	14 (70%)	6 (46.2%)	0 (0%)	61 (60.4%)
S58K	2 (4.2%)	2 (10%)	4 (30.8%)	20 (100%)	28 (27.7%)
S58 - wt	2 (4.2%)	0 (0%)	1 (7.7%)	0 (0%)	3 (3%)
Mixto	3 (6.2%)	4 (20%)	2 (15.4%)	0 (0%)	9 (8.9%)
T61M					
T61 - wt	48 (100%)	20 (100%)	13 (100%)	20 (100%)	101 (100%)
S117N					
S117 - wt	45 (93.8%)	19 (95%)	11 (84.6%)	14 (70%)	89 (88.1%)
S117N	2 (4.2%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (2%)
Mixto	1 (2.1%)	1 (5%)	2 (15.4%)	0 (0%)	4 (4%)
SD	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (30%)	6 (5.9%)
I173L					
I173 - wt	39 (81.3%)	17 (85%)	12 (92.3%)	20 (100%)	88 (87.1%)
I173L	5 (10.4%)	1 (5%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (5.9%)
Mixto	4 (8.3%)	2 (10%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (5.9%)
SD	0 (0%)	0 (0%)	1 (7.7%)	0 (0%)	1 (1%)
Haplotipo					
FRTS	41 (85.4%)	14 (70%)	6 (46.2%)	0 (0%)	61 (60.4%)
FKTS	2 (4.2%)	2 (10%)	4 (30.8%)	14 (70%)	22 (21.8%)
FSTN	2 (4.2%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (2%)
Mixto	3 (6.3%)	4 (20%)	3 (23.1%)	0 (0%)	10 (9.9%)
Incompleto	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (30%)	6 (5.9%)
<i>pvdhps</i>					
A383G					
A383 - wt	23 (47.9%)	11 (55%)	5 (38.5%)	20 (100%)	59 (58.4%)
A383G	16 (33.3%)	7 (35%)	7 (53.8%)	0 (0%)	30 (29.7%)
Mixto	9 (18.8%)	2 (10%)	1 (7.7%)	0 (0%)	12 (11.9%)
A553G					
wt	48 (100%)	20 (100%)	13 (100%)	20 (100%)	101 (100%)

Haplotipo					
AA	23 (47.9%)	11 (55%)	5 (38.5%)	20 (100%)	59 (58.4%)
GA	16 (33.3%)	7 (35%)	7 (53.8%)	0 (0%)	30 (29.7%)
Mixto	9 (18.8%)	2 (10%)	1 (7.7%)	0 (0%)	12 (11.9%)
<hr/>					
<i>pvm-dr1</i>					
M908L					
M908L	48 (100%)	20 (100%)	9 (69.2%)	0 (0%)	77 (76.2%)
M908 - wt	0 (0%)	0 (0%)	2 (15.4%)	18 (90%)	20 (19.8%)
Mixto	0 (0%)	0 (0%)	2 (15.4%)	1 (5%)	3 (3%)
SD	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)	1 (1%)
T958M					
T958M	45 (93.8%)	20 (100%)	13 (100%)	20 (100%)	98 (97%)
T958 - wt	1 (2.1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1%)
Mixto	2 (4.2%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (2%)
Y976F					
wt	38 (79.2%)	18 (90%)	13 (100%)	19 (95%)	88 (87.1%)
Y976F	3 (6.2%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (3%)
Mixto	7 (14.6%)	2 (10%)	0 (0%)	0 (0%)	9 (8.9%)
SD	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)	1 (1%)
F1070L					
F1070 - wt	48 (100%)	20 (100%)	13 (100%)	20 (100%)	101 (100%)
F1076L					
F1076 - wt	40 (83.3%)	19 (95%)	13 (100%)	20 (100%)	92 (91.1%)
F1076L	3 (6.2%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (3%)
Mixto	5 (10.4%)	1 (5%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (5.9%)
Haplotipo					
LMYFF	37 (77.1%)	18 (90%)	9 (69.2%)	0 (0%)	64 (63.4%)
LMFFL	3 (6.2%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (3%)
LTYFF	1 (2.1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1%)
MMYFF	0 (0%)	0 (0%)	2 (15.4%)	18 (90%)	20 (19.8%)
Mixto	7 (14.6%)	2 (10%)	2 (15.4%)	1 (5%)	12 (11.9%)
Incompleto	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)	1 (1%)

Tabla S7. Comparación de los resultados por PCR y el ensayo AmpliSeq para la genotipificación de *pfhrp2/3*.

HRP2		AmpliSeq		
		Delección	Presente	Inconcluso
PCR	Delección	33	1	7
	Presente	18	0	24
HRP3		AmpliSeq		
		Delección	Presente	Inconcluso
PCR	Delección	10	13	4
	Presente	1	5	0

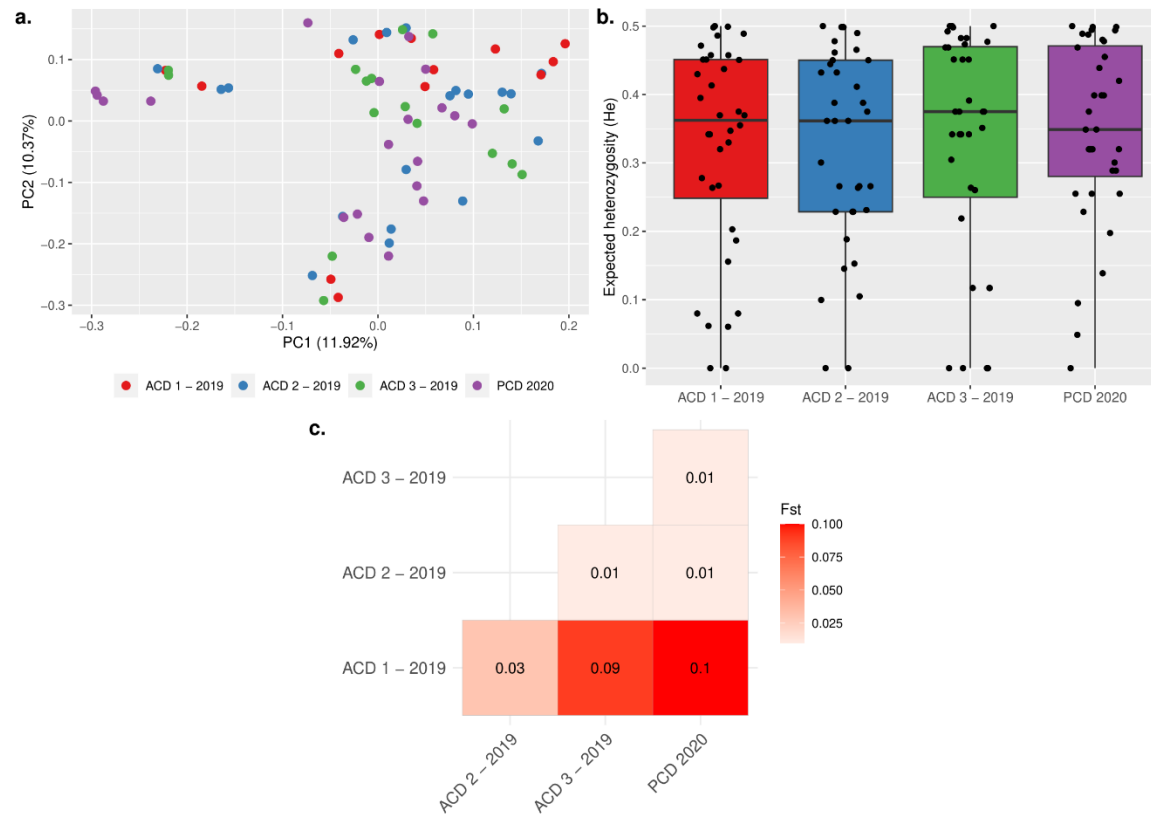


Figure S1. Clusterización, diversidad y diferenciación genética de las muestras de Pv en NJ. Las muestras fueron clasificadas según el tiempo de colección: una de las 3 visitas de detección activa de casos (ACD) en 2019 o la detección pasiva de casos (PCD) en 2020. (a) PCA de 68 muestras de Pv en NJ. (b) Heterocigosidad esperada (He). Cada punto representa la media He de 36/41 posiciones del *barcode* de SNP para todas las muestras de cada grupo. (c) Estadístico Fst por pares entre los grupos. El esquema de color del mapa de calor se basó en el máximo y mínimo de los valores Fst (números en el centro de cada cuadrado).

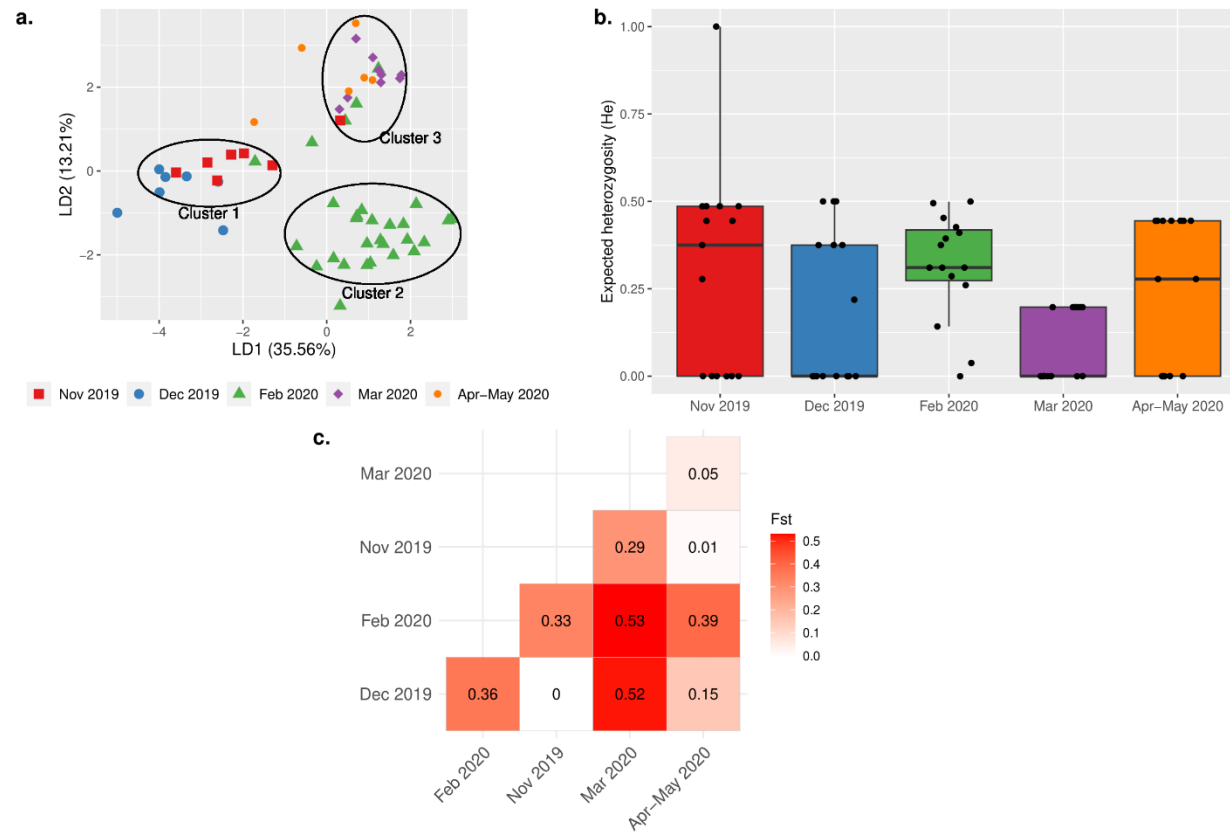


Figure S2. Clusterización, diversidad y diferenciación genética de las muestras de Pv en NJ. (a) PCA de 58 muestras de Pv en NJ. (b) Heterocigosidad esperada (H_e). Cada punto representa la media H_e de 15/28 posiciones del *barcode* de SNP para todas las muestras de cada grupo. (c) Estadístico F_{st} por pares entre los grupos. El esquema de color del mapa de calor se basó en el máximo y mínimo de los valores F_{st} (números en el centro de cada cuadrado).

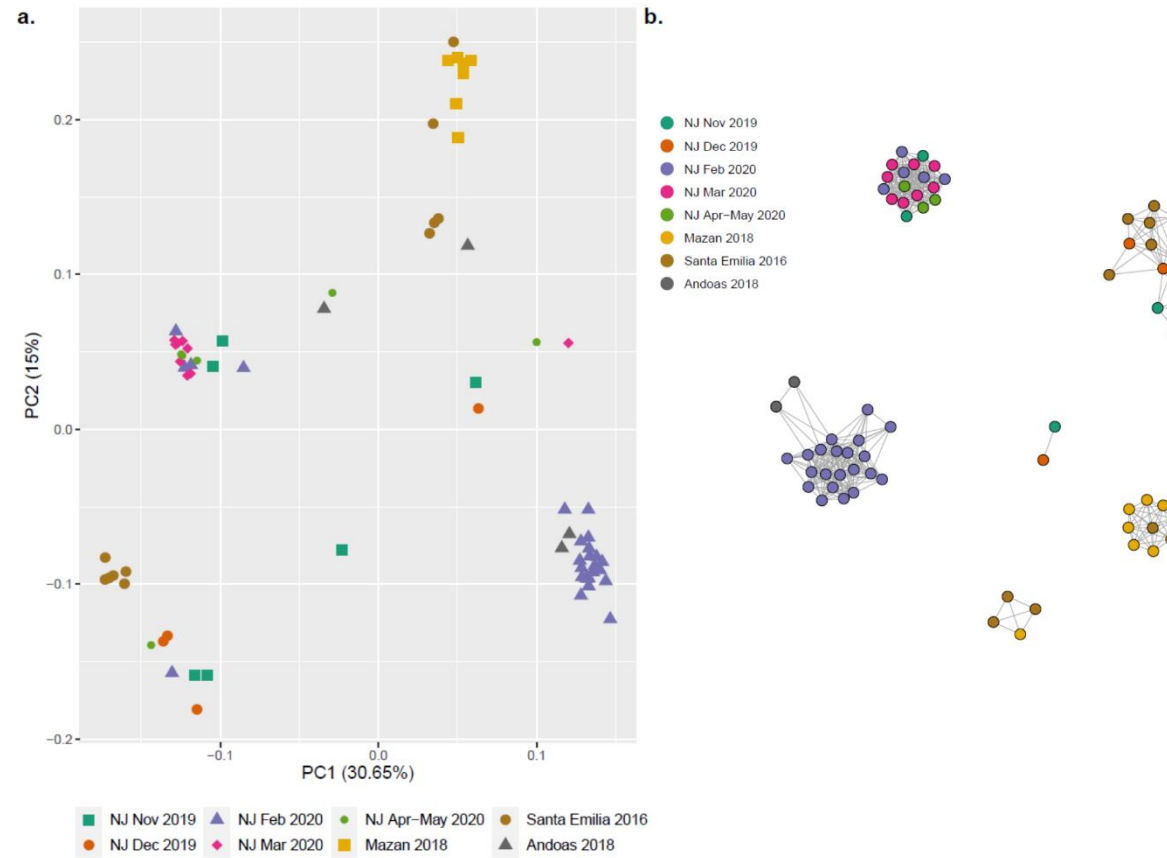


Figure S3. Estructura poblacional y red de IBD de las muestras de Pf en NJ (por meses) y otras áreas remotas. (a) PCA de todas las muestras de Pf. Los esquemas de forma/color representan cada área/año de colección. Para las muestras de NJ, se agregó el mes de colección. (b) Red inferida por IBD entre muestras de Pf. Los bordes que conectan los pares de parásitos indican que >45% de sus genomas descienden de un ancestro común. Los colores de los nodos indican los diferentes grupos.

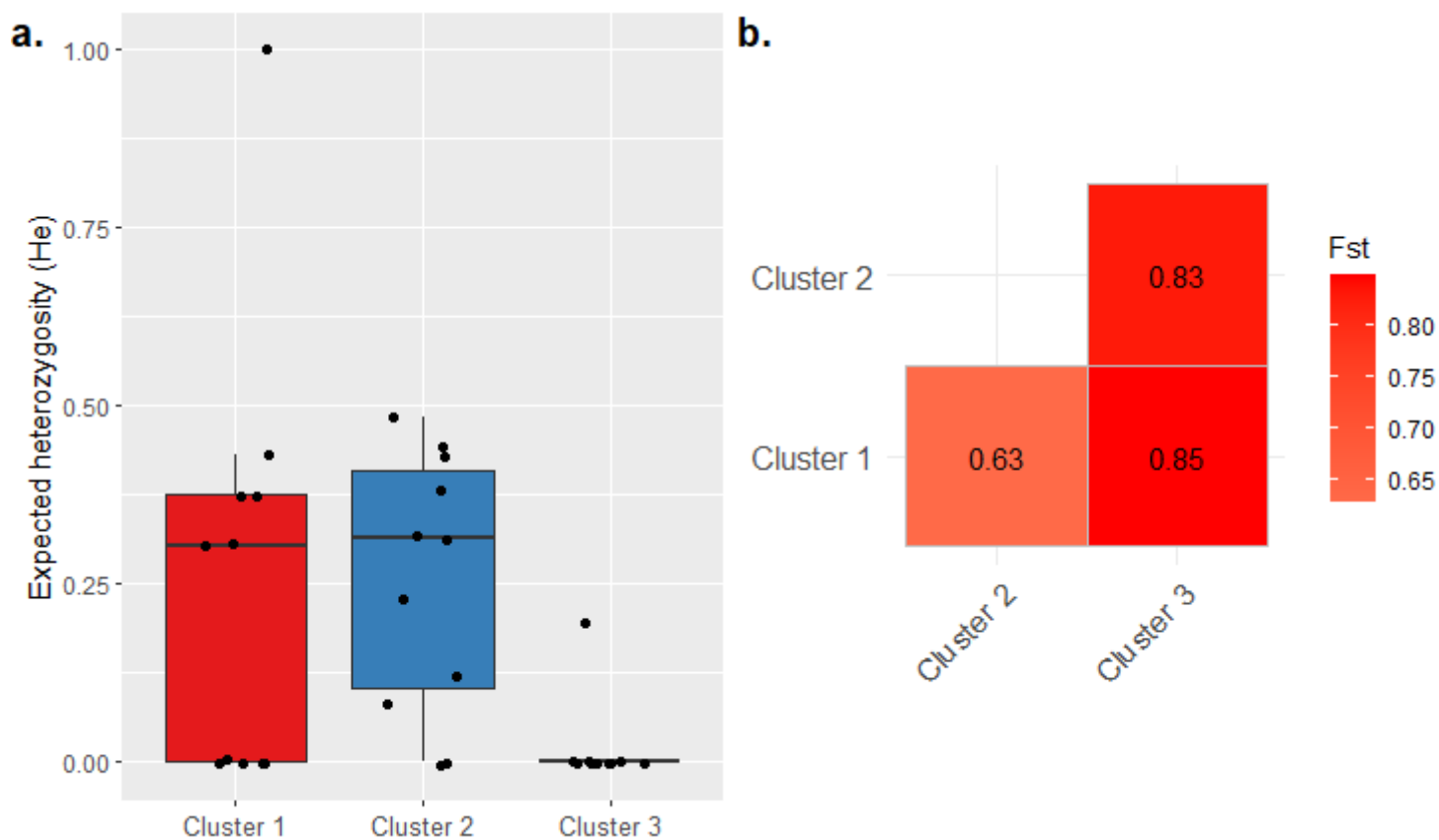


Figura S4. Diversidad y diferenciación genética de los clústeres temporales de Pf en NJ. (a) Heterocigosidad esperada (He). Cada punto representa la media de 15/28 posiciones no fijas del código de barras SNP para todas las muestras de cada grupo. (c) Estadístico Fst por pares entre los grupos. El esquema de color del mapa de calor se basó en el máximo y mínimo de los valores Fst (números en el centro de cada cuadrado).

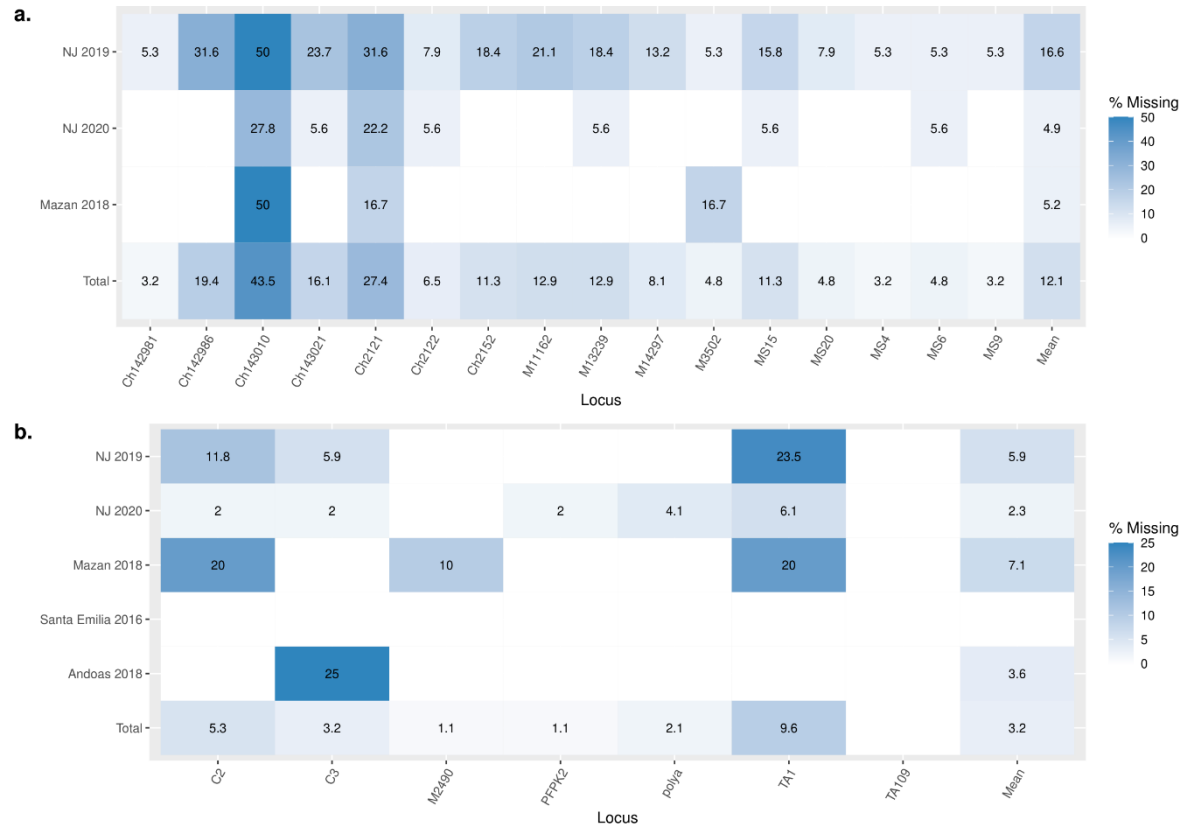


Figura S5. Porcentaje de data faltante en la genotipificación por microsatélites (MS). Las muestras de *P. vivax* (A) y *P. falciparum* (B) fueron genotipificadas con un panel de 16 y 7 MS, respectivamente. Se muestra la proporción de data faltante por grupos según localidad y año. Excepto con el marcador Ch14.3010 de *P. vivax*, todos los microsatélites tuvieron una adecuada eficiencia de amplificación.

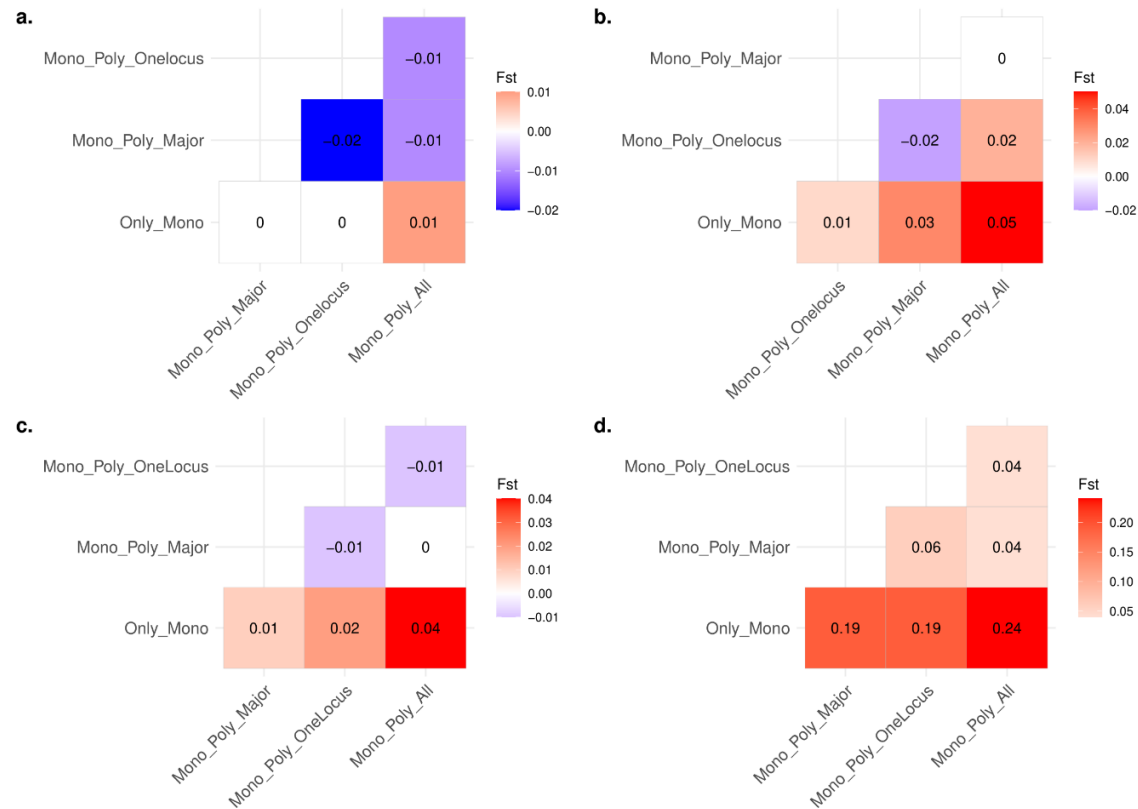


Figura S6. Inclusión de muestras policlonales y sus haplotipos secundarios. Estadístico F_{st} por pares entre los grupos de sets agregados (A y C) y separados (B y D) según lo descrito en la sección 5.10 para los haplotipos construidos de las muestras de *P. vivax* (A y B) y *P. falciparum* (C y D). El esquema de colores del mapa de calor se basó en los valores máximo y mínimo de F_{st} . El cálculo del F_{st} (representado en el número dentro de cada recuadro) se realizó usando el *barcode* de SNPs. Only_Mono: solo haplotipos de muestras monoclonales. Mono_Poly_Major: haplotipos principales de muestras mono y policlonales. Mono_Poly_OneLocus: haplotipos principales de muestras mono y policlonales + haplotipos secundarios de muestras policlonales en solo un locus. Mono_Poly_All: todos los haplotipos principales y secundarios de muestras mono y policlonales. La mayoría de comparaciones de sets no tuvieron diferencias entre sí, excepto los haplotipos de muestras monoclonales en los sets separados de *P. falciparum*.

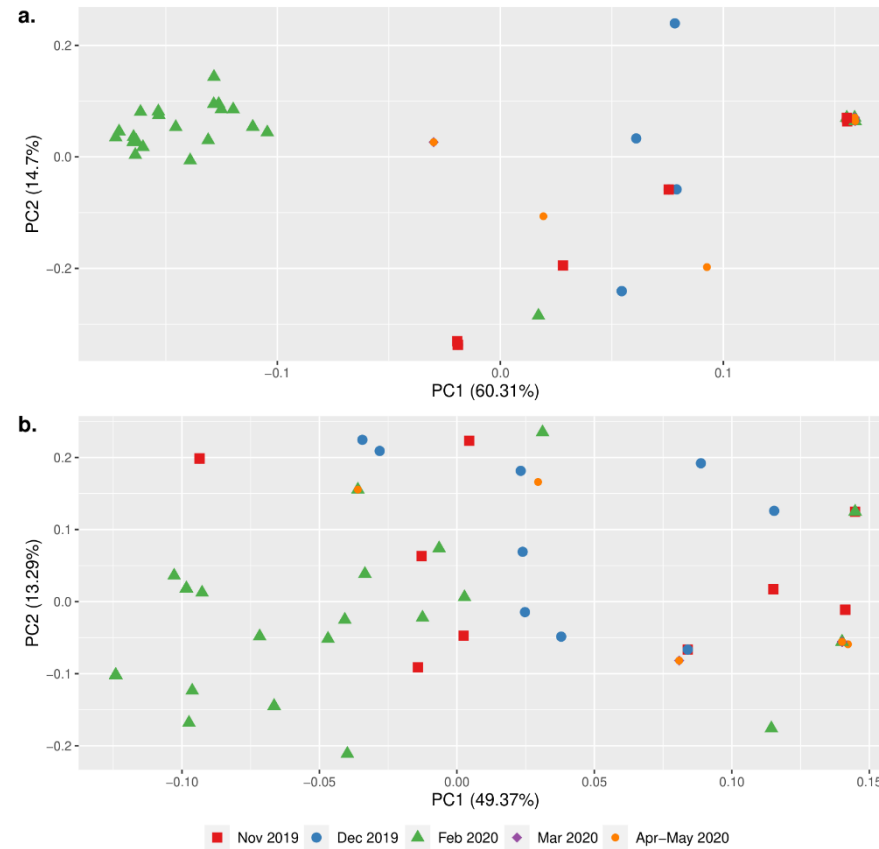


Figura S7. Estructura poblacional de *P. falciparum* en NJ usando microsatélites (MS) y el *barcode* de SNPs del ensayo AmpliSeq. PCA de 68 muestras de *P. falciparum* colectadas en NJ utilizando el *barcode* de SNPs (A) o los microsatélites (B). Los esquemas de forma/color representan a cada uno de los tiempos de colección. Solo los SNPs pudieron diferenciar el clúster compuesto de muestras de febrero 2020.