



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

MICRO-EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR
DE LAS INFECCIONES QUE
CONTRIBUYEN A MANTENER LA
TRANSMISIÓN DE *Plasmodium vivax* EN
COMUNIDADES EN VÍAS DE
ELIMINACIÓN DE LA MALARIA EN LA
REGIÓN LORETO

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

ROBERSON RAMIREZ SAAVEDRA

LIMA – PERÚ

2024

ASESOR

Dra. Katherine Torres Fajardo

CO-ASESORES

Dra. Dionicia Gamboa Vilela

Dr. Ananias Escalante Manzo

JURADO EVALUADOR

PRESIDENTE

Dr. Jorge Enrique Rodriguez Bailon

VOCAL

Dr. Pedro Eduardo Romero Condori

SECRETARIO(A)

Dra. Maritza Mercedes Calderon Sanchez

DEDICATORIA

Mi trabajo de investigación está dedicado a mi compañía de toda la vida, mi esposa y amiga Margarita Rivera y mis hijos Christopher y
Emili.

A mis padres Américo Ramírez y Dolores Saavedra, al igual que mis hermanas Veronica e Ivonne. Adicionalmente a mis queridos suegros Perlita y Luis Rivera que ahora ya no nos acompaña.

AGRADECIMIENTO

A mi querida Asesora Dra. Katherine y Dra. Dionicia por sus consejos, tiempo y paciencia hacia mi persona; y a todos los integrantes del grupo malaria, infinitamente agradecidos con todos.

A todas las personas que dieron su consentimiento para participar en este estudio.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

- Esta tesis fue financiada por el Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación tecnológica (CONCYTEC) Perú, a través de su unidad ejecutora Fundación Nacional para el Desarrollo de la Ciencia, Tecnología e Innovación tecnológica (FONDECYT) Perú contrato N° 165-2020-FONDECYT.
- Este trabajo también fue financiado por International Center of Excellence for Malaria Research (ICEMR 2.0), Grant U19AI089681 (NIH).

18% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...




Filtrado desde el informe

- ▶ Bibliografía
- ▶ Texto citado
- ▶ Texto mencionado
- ▶ Coincidencias menores (menos de 10 palabras)

Exclusiones

- ▶ N.º de fuentes excluidas

Fuentes principales

- 17%  Fuentes de Internet
- 14%  Publicaciones
- 13%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alertas de integridad para revisión

No se han detectado manipulaciones de texto sospechosas.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

TABLA DE CONTENIDO

Resumen

Abstract

I.	Introducción General	1
II.	Marco teórico	5
	2.1 Estado actual de la malaria en el Perú	5
	2.2 Ciclo biológico de <i>Plasmodium spp.</i>	5
	2.3 Micro-epidemiología de la transmisión de la malaria	8
	2.4 La movilización humana y la malaria	11
	2.5 El vector y su rol en la transmisión	13
	2.6 Características de las infecciones causadas por <i>P. vivax</i>	15
	2.7 Genética y genómica poblacional de <i>P. vivax</i>	16
III.	Justificación	25
IV.	Objetivo general	27

Capítulo 1 : Evaluación de la prevalencia, diversidad genética y estructuración poblacional de *Plasmodium vivax* durante la vigilancia de casos en la comunidad de Santa Emilia

I.	Introducción	28
II.	Objetivos	31
III.	Metodología	32
	3.1 Área de estudio y población	32
	3.2 Criterios de exclusión e inclusión de muestras biológicas	33
	3.3 Diseño de estudio	34

3.3 Diagnóstico microscópico y molecular de <i>P. vivax</i>	36
3.4 Genotipificación y electroforesis capilar de <i>P. vivax</i>	37
3.6 Análisis de datos	38
IV. Resultados	42
V. Discusión	51
VI. Conclusiones	58

Capítulo 2: Descripción de la movilización humana, su importancia en la transmisión de la malaria y la diversidad genómica de *P. vivax* en las comunidades de Libertad y Urcomiraño

I. Introducción	59
II. Objetivos	62
III. Metodología	63
3.1 Área de estudio y población	63
3.2 Criterio de exclusión e inclusión de muestras biológicas	66
3.3 Diseño de estudio	66
3.4 Diagnóstico microscópico y molecular de la malaria	68
3.5 Secuenciamiento del genoma completo de <i>P. vivax</i>	69
3.6 Limpieza de productos de amplificación genómica	70
3.7 Preparación de bibliotecas	70
3.8 Análisis estadístico	72
IV. Resultados	76
V. Discusión	95

VI.	Conclusiones	100
VII.	Conclusiones generales del capítulo 1 y 2	101
VIII.	Limitaciones del estudio del capítulo 1 y 2	102
IX.	Referencias bibliográficas	103

ÍNDICE DE TABLAS

Capítulo 2

Tabla 1.	Detección de casos de malaria en las comunidades de Libertad y Urcomiraño	77
Tabla 2.	Proporción de viajeros, sus infecciones y casos submicroscópicas en las comunidades de Libertad y Urcomiraño	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo biológico de <i>Plasmodium</i> spp	8
Capítulo 1		
Figura 2.	Mapa de la ubicación geográfica de la comunidad de Santa Emilia.	33
Figura 3.	Diseño de estudio para la colección de datos y muestras en Santa Emilia.	35
Figura 4.	Proporción de infecciones submicroscópicas durante la vigilancia de casos 2015-2016.	43
Figura 5.	Métricas de diversidad genética a través del tiempo.	46
Figura 6.	Diferenciación poblacional de las poblaciones de <i>P. vivax</i> .	47
Figura 7.	Red de expansión de haplotipos 2013 y 2015-2016.	49
Figura 8.	Estructuración poblacional de <i>P. vivax</i> entre los años 2013 y 2015-2016.	52
Capítulo 2		
Figura 1.	Mapa de la ubicación geográfica de las comunidades de Libertad y Urcomiraño ubicados en la cuenca del Mazán y Napo	65
Figura 2.	Diseño de estudio para la colecta de datos y muestras colectadas durante el 2021 y 2022 en comunidades de Mazán (Libertad y Urcomiraño)	69
Figura 3.	Proporción de los motivos de viaje de las comunidades de Libertad y Urcomiraño.	81
Figura 4.	Análisis de redes sociales de los patrones de movilización en Libertad y Urcomiraño.	82
Figura 5.	Factores de riesgo asociados a malaria.	83
Figura 6.	Diversidad genética entre comunidades.	85
Figura 7.	Análisis de componentes principales por año y comunidad de colecta	85-86
Figura 8.	Diferenciación poblacional por año de colecta	87

Figura 9.	Análisis de identidad por descendencia (IBD) por año de colecta	88
Figura 10.	Diferenciación poblacional (F_{st}) por comunidad de colecta.	89
Figura 11.	Estructuración poblacional de <i>P. vivax</i> por comunidad de colecta.	90
Figura 12.	Árbol filogenético de malaria colectadas por comunidad.	92
Figura 13.	Identidad por descendencia (IBD) por año de colecta.	94

ABREVIATURAS

OMS	:	Organización Mundial de la Salud
MINSA	:	Ministerio de Salud
PCR	:	Reacción en cadena de la polimerasa
ADN	:	Ácido desoxirribonucleico
ARNr	:	Ácido ribonucleico ribosomal
<i>P. vivax</i>	:	<i>Plasmodium vivax</i>
<i>P. falciparum</i>	:	<i>Plasmodium falciparum</i>
Ne	:	Número efectivo poblacional
<i>He</i>	:	Heterocigocidad esperada
Fst	:	El índice de fijación
MOI	:	Multiplicidad de infección
Hs	:	Diversidad genética intrapoblacional
DL sin cc	:	Desequilibrio de ligamiento sin corrección clonal
θ	:	Ratio mutacional poblacional
Djost	:	Diferenciación poblacional de Jost
AMOVA	:	Análisis molecular de la varianza
SNPs	:	Polimorfismo de un simple nucleótido
ACP	:	Análisis de componentes principales
IBD	:	Identidad por descendencia.
cM	:	CentiMorgan
NJ	:	Nighbor Joining
ICEMR	:	Centro Internacional de Excelencia de Investigación en Malaria
PAMAFRO	:	Proyecto de control de la malaria en zonas fronterizas de la región andina: Un enfoque comunitario

RESUMEN

La transmisión de la malaria sigue siendo un problema de salud pública persistente en la Amazonía peruana, reflejada en la alta morbilidad de casos causados por *Plasmodium vivax* dentro de un contexto de malaria residual a nivel micro-epidemiológico. Ante esta situación, resulta imperativo emplear herramientas como la genética y la genómica poblacional para comprender mejor los factores que mantienen la transmisión residual de la malaria.

El objetivo principal de este estudio fue caracterizar molecularmente la micro-epidemiología de las infecciones por *P. vivax* que contribuyen a perpetuar la transmisión en comunidades remotas que están en proceso de eliminación de la malaria.

En el primer capítulo de esta tesis, los resultados destacan la presencia de un 40% de infecciones submicroscópicas y una alta diversidad genética ($H_e = 0.70 \pm 0.10$), sin cambios significativos entre los períodos 2013 y 2015-2016 ($p\text{-valor} > 0.05$), así como en otras métricas de diversidad genética. Además, se detectaron parásitos clonales, linajes de diferentes orígenes y flujo genético ($F_{st} > 0.5$), evidenciado por la introducción de parásitos genéticamente distintos.

Este hallazgo motivó el desarrollo del segundo capítulo, que evaluó a los viajeros infectados y caracterizó los patrones de movilización humana, además de analizar la diversidad genómica poblacional y las relaciones genéticas de los parásitos recolectados en las comunidades de Libertad y Urcomiraño. Se encontró un 21% de

infecciones por *Plasmodium* en los viajeros, de las cuales el 89% eran submicroscópicas. La movilidad humana resultó ser heterogénea, con desplazamientos frecuentes hacia Mazán, Iquitos y varias quebradas.

Por último, los parásitos recolectados presentaron baja diversidad genómica, con poblaciones clonales (IBD = 90%), la presencia de flujo genético ($F_{st} = 0.15-0.25$) entre Libertad y Urcomiraño, y linajes clonales que se mantuvieron a lo largo del tiempo, en función de la proximidad geográfica y el momento de la recolección.

En conclusión, tanto las infecciones submicroscópicas como la movilización humana parecen desempeñar un papel clave en el mantenimiento de la transmisión de la malaria residual, revelando nuevos aspectos, a nivel de la genética de los parásitos, que contribuyen con la micro-epidemiología de la malaria en las comunidades estudiadas.

Palabras claves:

P. vivax, diversidad genética, genómica poblacional, movilización humana, identidad por descendencia (IBD), cuello de botella.

ABSTRACT

Malaria transmission is a persistent public health problem in the Peruvian Amazon. This persistence is reflected in the increased morbidity of cases caused by *P. vivax* in a micro-epidemiological context of residual malaria within the Peruvian Amazon. For this reason, there is an urgent need to use tools such as population genetics and genomics to help explain the maintenance of residual malaria transmission at the micro-epidemiological level. The overall objective of this study was to molecularly characterize the micro-epidemiology of *P. vivax* infections that contribute to the maintenance of transmission in remote communities undergoing malaria elimination. The results in Chapter 1 of this thesis highlight the presence of 40% submicroscopic infections, with high genetic diversity ($H_e=0.70 \pm 0.10$) with no significant changes ($p\text{-value}>0.05$) between 2013 and 2015-2016 and the other metrics of genetic diversity. Clonal parasites and lineages with different origins were also found, plus the presence of gene flow ($F_{st}>0.5$) evidenced by the entry of new genetically unrelated parasites. Due to this last finding, Chapter 2 of this thesis was developed, where the infected travelers were evaluated and the mobilization and human mobilization were characterized, and the population genomic diversity and genetic relationships of the parasites collected in Libertad and Urcomiraño were also evaluated. We found 21.0% of *Plasmodium* spp. infections in travelers, 89% of these infections were submicroscopic. Human mobilization was heterogeneous with frequent trips to Mazan, Iquitos and creeks. Finally, the parasites collected showed low genomic diversity, with clonal populations ($IBD=90\%$), presence of gene flow ($F_{st}=0.15\text{-}0.25$) between

Libertad and Urcomiraño, plus clonal lineages that have been maintained according to the time of collection and the geographic proximity to the collection site. In conclusion, submicroscopic infections as well as human mobilization are having a role in maintaining residual malaria transmission, at level of parasite genetics, that contributes with the malaria micro-epidemiology in the communities included in this study.

Keywords:

P. vivax, genetic diversity, population genomics, human mobilization, identity by descent (IBD), bottleneck.

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

A pesar de todos los esfuerzos desplegados en los últimos años para eliminar la malaria, esta continúa siendo un problema de salud global. Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS), ha informado que se han producido cerca de 247 millones de casos de malaria en 84 países endémicos en todo el mundo (1). En Perú, el año 2023 se han reportado más de 22 mil casos y cerca del 90% se concentran en la Región Loreto, de estos el 84% de las infecciones son producidas por *P. vivax*. Dentro de la región Loreto los distritos de Napo, Mazan y Nauta son considerados de alto, medio y bajo riesgo de transmisión de la malaria respectivamente (2). Estos distritos concentran comunidades como Urcomiraño, Libertad y Santa Emilia donde históricamente han reportado incremento de casos desde el año 2013, siendo el 2015 el año más crítico (3).

Estudios previos en diferentes comunidades del distrito de Mazán, que incluyeron a Libertad y Urcomiraño, encontraron que la proporción de infecciones por *P. vivax* fue altamente heterogénea, dentro y entre las comunidades estudiadas, asociadas a factores socio-demográficos específicos a cada comunidad, con presencia de un gran número de infecciones con baja parasitemia, ahora llamadas submicroscópicas (4). Otro estudio en dos comunidades con características ecológicas contrastantes como Cahuide (a la altura del kilómetro 56 de la carretera Iquitos – Nauta) y Lupuna (comunidad ribereña), también encontraron una prevalencia heterogénea de *Plasmodium* spp. influenciadas por las características socio-demográficas específicas (5,6). Estos y otros estudios confirman la micro-heterogeneidad o

micro-epidemiología de la transmisión de la malaria en comunidades de la Amazonía Peruana con características ecológicas-ambientales diversas que podrían ser extrapolados a otros entornos donde tanto *P. vivax* y *P. falciparum* coexisten.

Santa Emilia es una comunidad remota y aislada geográficamente, que ha tenido intervenciones intermitentes durante mucho tiempo por parte del MINSA. Durante el año 2013 presentó un alto número de casos de malaria, siendo las infecciones con baja parasitemia las predominantes, sumado a esto se reportó una moderada diversidad genética con un 40% de infecciones policlonales (7), esto fue efectuado durante la vigilancia realizada por el Programa Centro Internacional de Excelencia en Investigación en Malaria de la Amazonía (Amazonia – “ICEMR”, por sus siglas en Inglés). En este estudio también se encontraron señales de flujo genético entre las comunidades estudiadas generado probablemente por la movilización humana. Debido a estos resultados, el mismo programa continuó realizando la vigilancia de los casos durante el 2015 y 2016. En este sentido, en el capítulo 1 de esta tesis se utilizaron estas muestras para caracterizar molecularmente la micro-epidemiología de las infecciones que contribuyen a mantener la trasmisión de la malaria, la diversidad genética y los cambios de las poblaciones clonales durante la vigilancia del 2013 y 2015-2016.

Para lograr este objetivo se realizó el diagnóstico molecular y se midió la prevalencia de las infecciones submicroscópicas, así como las métricas de diversidad genética, un análisis de cuello de botella y se establecieron las relaciones

genéticas mediante una red de expansión de haplotipos de manera comparativa entre las muestras colectadas el 2013 y las del 2015-2016.

Los resultados encontrados confirman la micro-epidemiología de la malaria en Santa Emilia y resalta la importancia de las infecciones submicroscópicas como reservorios para mantener una alta transmisión con muy alta diferenciación poblacional y la presencia de parásitos importados posiblemente por la movilización humana. Debido a este último resultado se desarrolló el capítulo 2 de este trabajo para evaluar el rol de la movilización humana en la transmisión de la malaria y la micro-epidemiología en las comunidades de Libertad y Urcomiraño, que durante los últimos años han tenido intervenciones a través del Plan Malaria Cero por parte del MINSA. Para esto se caracterizó y determinó los casos en los viajeros, la genómica poblacional de los parásitos de *P. vivax* y sus relaciones genéticas durante los años 2021 y 2022.

Los resultados del capítulo 2 muestran a los viajeros que estarían actuando como reservorios del parásito, quienes al regresar infectados a sus comunidades de origen, contribuyen también a mantener la transmisión, con parásitos que presentan una baja diversidad genómica, aparentemente clonales y diferentes con respecto a los parásitos colectados desde el año 2006 hasta el 2015. Por lo tanto, en ambos capítulos de esta tesis se sugiere que las personas con infecciones submicroscópicas y los viajeros deberían ser considerados dentro de las estrategias de control de la malaria en el Perú, utilizando herramientas más sensibles para identificar a los individuos infectados y estableciendo un monitoreo cercano de estas poblaciones

móviles para evitar la introducción de nuevos parásitos en áreas en vías de eliminación de la malaria.

II. MARCO TEORICO

2.1 Estado actual de la malaria en el Perú

La malaria en el Perú es un problema que reta constantemente al sistema de salud. Durante el año 2023, y hasta la semana 52, en el territorio peruano se han reportado 22,349 casos de malaria, con un incremento de 6,539 casos comparado con el año 2020 (8). La mayor concentración de casos de malaria se ha reportado en la Amazonía Peruana (20,345 casos), principalmente en distritos remotos como Andoas, Pastaza, Urarinas, Trompeteros, Yavarí, Balsa Puerto, Tigre, Lagunas y dentro de la ciudad de Iquitos, San Juan Bautista es el distrito con mayor número de casos. El segundo departamento que concentra mayor número de casos es Amazonas, que presentó 1,093 casos, seguido de Junín con 403 casos y Cusco con 263 casos (8). La presencia de las infecciones en la actualidad sugiere la continuidad de la transmisión siendo ésta heterogénea a nivel de espacio y tiempo, a pesar de los planes de control y eliminación desplegados por el Ministerio de Salud (MINSA).

En el Perú se observa mayor frecuencia de infecciones producidas por *P. vivax* (85%), seguida de *P. falciparum* (14%), y por último *P. malariae* (1%) (3). En el Perú, no se transmiten *P. ovale* ni *P. knowlesi*.

2.2 Ciclo biológico de *Plasmodium* spp.

El ciclo biológico del parásito que causa malaria es complejo, marcado por exitosas rondas de replicación asexual a través de diferentes estadios y tejidos, tanto en el

organismo vertebrado como hospedero intermediario (fase asexual) y en el mosquito (fase sexual) como hospedero definitivo (9). El ciclo del parásito comienza cuando el mosquito hembra infectado con *Plasmodium* spp. pica a su hospedero vertebrado inyectando el esporozoito a través de la piel del humano, y luego el esporozoito móvil entra al torrente sanguíneo, llegando hasta el hígado, y de esta forma evita el sistema inmune del hospedero. Una vez que el esporozoito llega a cruzar la barrera sinusoidal del hígado le permite ingresar a los hepatocitos (9,10). Luego ellos establecen una vacuola parasitófora, y después se diferencian en su primera ronda de replicación asexual. Cerca de dos días o más, dependiendo de la especie de *Plasmodium*, un multinucleado esquizonte exo-eritrocítico contiene cientos de merozoitos. Sin embargo, algunas especies de parásitos tales como *P. vivax* y *P. ovale* pueden entrar en un periodo de latencia debido a que se transforman en hipnozoito no replicante en vez de esquizonte. Estos hipnozoitos pueden permanecer días, meses o años en latencia en el hígado y causar los relapsos (11). Una vez que salen del hepatocito los merozoitos son agrupados en una membrana formando una vesícula llamada merosoma, y nuevamente son liberados al torrente sanguíneo, vía la barrera sinusoidal del hígado. Los merozoitos invaden los glóbulos rojos donde ocurre una segunda fase esquizogonia asexual. Este ciclo de reproducción asexual produce más de 72 merozoitos en el transcurso de 48 a 72 horas (9). A través de repentinas rondas de invasión y crecimiento, el parásito produce infecciones agudas y eventualmente infecciones crónicas. Algunas especies como *P. vivax* solo invaden los reticulocitos (eritrocitos inmaduros que representan el 3 al 5% de toda la población de eritrocitos circulantes). Otros como

P. falciparum no se restringen y pueden infectar una alta proporción de eritrocitos ya sean jóvenes o maduros, esto permite una alta carga parasitaria (9,12), este factor implicado en la capacidad de *P. falciparum* para causar malaria severa.

El ciclo sexual se inicia cuando una pequeña proporción de parásitos asexuales producen progenie sexual, que es el gametocito. Los gametocitos maduros pueden circular en el torrente sanguíneo por varios días, lo cual incrementa sus posibilidades de transmisión hacia el mosquito. Unos pocos minutos después de ingresar al intestino del mosquito, tanto el gametocito masculino como el femenino utilizan proteasas para salir del eritrocito y luego se diferencian en ocho microgametos y un macrogameto, respectivamente (9,13). Estos gametos se fusionan para producir el cigoto. El cigoto se transforma hasta el ooquinetto móvil, el cual cruza la barrera epitelial del intestino medio para formar un ooquiste. En el ooquiste, los parásitos llegan al tercer ciclo asexual de replicación para producir cientos de esporozoitos que son liberados hacia la hemolinfa del mosquito. Los esporozoitos migran hacia las glándulas salivares del mosquito y permanecen dentro hasta que se transmita a un nuevo hospedero vertebrado a través de la picadura del mosquito para empezar el ciclo nuevamente.

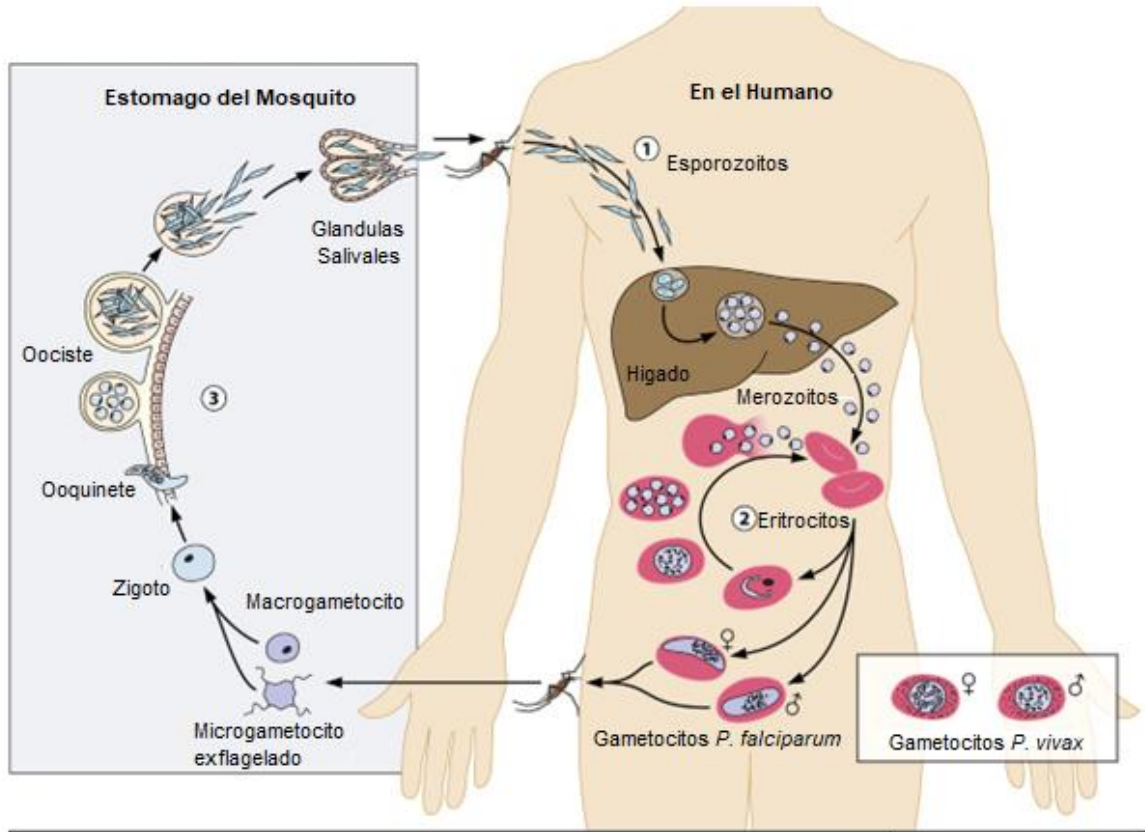


Figura 1: Ciclo Biológico de *Plasmodium* spp. (Referencia <https://microbeonline.com/asexual-life-cycle-of-plasmodium-falciparum/>) modificado y traducido al español por el autor de esta tesis (Biological cycle © 2023 by Teun Bousema and Chris Drakeley is licensed under CC BY-NC-SA 4.0. To view a copy of this license, visit <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>).

2.3 Micro-epidemiología de la transmisión de la malaria

La micro-epidemiología según Banniester (14) es el estudio de la variación de la frecuencia de casos de malaria entre hogares u otras agrupaciones, entre subcomunidades dentro de una comunidad o entre comunidades vecinas u otras agregaciones socio-espaciales similares como asentamientos agrícolas y zonas de captación de casos como los centros de salud (14).

Diversos estudios epidemiológicos han determinado que la transmisión no es homogénea entre las comunidades, evidenciando la existencia de una micro-epidemiología dentro y entre comunidades. Por ejemplo, en Colombia evaluaron los determinantes de la distribución de las infecciones mixtas a nivel micro-epidemiológico en el riesgo de la malaria en 25 comunidades, encontrándose una mayor distribución del 43.2% de infecciones mixtas (*P. vivax* junto a *P. malariae*), y un 65% de frecuencia de *P. vivax* en todas las comunidades (15). Por otro lado, un estudio en Vietnam Central, a nivel micro-epidemiológico, encontró que realizar actividades fuera de la vivienda durante la noche como beber y mirar televisión explicaron la exposición reciente a *P. vivax* y *P. falciparum* (16). Del mismo modo, en Camboya, el análisis a nivel de hogares e individuos en tres comunidades encontró que los factores de riesgo para contraer malaria estuvieron asociados a las reuniones nocturnas de los agricultores, las paredes de madera de las casas y el tipo de cultivo y estos explicarían la variación de la micro-epidemiología (17). Asimismo, un estudio de pequeña a moderada escala espacial (1 a 15km) en cuatro comunidades que incluían a Libertad y Urcomiraño dentro de la Amazonía Peruana, demostraron que la proporción de la parasitemia de *P. vivax* fue heterogénea dentro y entre las cuatro comunidades; y las viviendas sin malaria ubicadas cerca o dentro de un área o “cluster” de alto riesgo de transmisión (proporción de individuos en viviendas con parasitemia de *P. vivax* >60%) tenían más probabilidades de tener malaria; y los habitantes presentaban una alta proporción de infecciones submicroscópicas y asintomáticas (4).

Por lo tanto, la dinámica de transmisión de *P. vivax* es heterogénea a nivel de espacio – tiempo y los factores de riesgo asociados a ella son específicos, produciendo los diferentes contextos micro-epidemiológicos (6,19). Esta heterogeneidad se produce por la dinámica entre los diversos actores de la transmisión como el humano, el vector, el parásito y el medio ambiente.

El humano con sus costumbres, actividades y condiciones de vida juegan un rol importante durante la transmisión de la malaria. Diversos estudios han evidenciado que ciertos factores sociodemográficos se convierten en factores de riesgo asociados a malaria. Por ejemplo, en Tanzania los niños entre 4-14 años y la calidad de la construcción de las casas fueron factores de riesgo asociados a malaria (20). En Camboya, personas con viajes recientes a la selva (21) y en Etiopía niños entre 5 y 14 años de edad, jefes de hogar con menor nivel educativo y las viviendas con techo de hoja/paja fueron identificados como factores de riesgo (22). Del mismo modo, en la Amazonía Peruana se determinó que niños entre 8-14 años, y la residencia mayor a 5 años en la comunidad fueron los factores de riesgo asociados a malaria (6). Sumado a esto, factores como no tener animales de crianza como el ganado en el hogar y tener síntomas de malaria también mostraron tener una alta implicancia en la transmisión (5). Por último, niños entre 6 a 14 años cuya condición socio-económica de nivel bajo y casas construidas pobremente fueron los principales factores de riesgo (20). Por lo tanto, los factores de riesgo asociado a la malaria son heterogéneos bajo diferentes contextos epidemiológicos.

2.4 La movilización humana y la malaria

La movilización humana puede ser otro de los factores que contribuyen al resurgimiento y dispersión de la malaria, y sumado a esto el rol del vector que también permite expandir la enfermedad. Sin embargo, este último está limitado debido a la distancia máxima de vuelo del mosquito, que es de aproximadamente 600 metros (23).

Las personas viajan o se trasladan de un lugar a otro por diferentes razones, por ejemplo, motivos económicos, el deterioro del medio ambiente, conflictos y desastres naturales (24). Este movimiento de las personas con malaria desde una zona endémica a otra zona donde no existe malaria o donde se ha erradicado, permite el resurgimiento de la enfermedad, siempre y cuando el área tenga la característica de receptividad a la infección, como por ejemplo la presencia del mosquito vector y las características medioambientales necesarias (25). Por todo lo mencionado, se debe tener en cuenta la importancia del reservorio humano y su comportamiento.

Los datos del censo comunal de vivienda y registro de la población pueden proporcionar valiosa información a nivel individual para poder cuantificar las características socio-demográficas de la población a una escala temporal fina (26). Estos datos pueden extrapolarse con los casos de malaria para evaluar los factores de riesgo y los mecanismos que favorecen la transmisión de la malaria. Adicionalmente, las encuestas epidemiológicas de movilización proporcionan información sobre el tiempo, lugar, frecuencia de viaje, etc., lo que permite

conocer de manera aproximada el rol de la movilización en la transmisión de esta enfermedad.

Diversos estudios han evidenciado el rol del movimiento humano en la transmisión de malaria. Por ejemplo, trabajos realizados en China evidenciaron que el 93.4% de los casos fueron importados de África, el 5.9% de Asia y 0.4% de Oceanía (27). Adicional a esto, estudios utilizando censo y encuestas epidemiológicas concluyeron que el movimiento poblacional es heterogéneo entre países como Kenia, Tanzania y Uganda junto a la transmisión de malaria, y un estudio similar utilizando análisis espaciales de casos y registros de migración evidenciaron una mayor conectividad en el este de África y Asia central comparado con otros países y que las fuentes de la infección (*source*) y el destino (*sink*) estaban unidos por rutas de transmisión (28,29). Por otro lado, en la Amazonia Peruana el seguimiento de la movilización de las personas a través de GPS permitió identificar que viajar a la comunidad de Mazan por motivos de trabajo, incrementa el riesgo de tener malaria (30). Otro estudio realizado en las comunidades de Lupuna y Cahuide sugirió que la actividad migratoria relacionada a la ocupación permite la importación de casos de *P. falciparum* (31).

La movilización humana en la Amazonia y la transmisión de malaria, en muchos casos, está regido por las actividades laborales como por ejemplo el comercio, intensa agricultura y la extracción de madera. Evidencia de esto se mostró en el trabajo de Chuquiyaury (31), donde se sugirió que los adultos con actividad agrícola y maderera, adquirirían múltiples infecciones de malaria fuera del lugar del

domicilio principal, comportándose como reservorios humanos móviles y provocando la movilización del parásito dentro y entre micro regiones endémicas a esta enfermedad (31). Esto pone de manifiesto que las actividades ocupacionales propias de la zona exponen al humano de manera directa o indirecta a la picadura del mosquito.

Sin embargo, no siempre las actividades ocupacionales migratorias permiten el mantenimiento de la transmisión, sino también las actividades recreacionales, esto se evidenció en las cuencas de Mazan y Napo (32). Por lo tanto, existe evidencia de la importancia de la movilización humana en la transmisión y es necesario seguir estudiando este aspecto en escenarios donde existe mayor movimiento poblacional para que nos brinde información más real y fina para que permita, en el futuro, diseñar estrategias específicas para estas poblaciones con el objetivo de evitar y controlar la importación de casos y con ello los brotes o resurgimiento de la malaria.

2.5 El vector y su rol en la transmisión

El vector también juega un rol esencial durante la transmisión de la malaria. Se han descrito cerca de 530 especies de *Anopheles*; pero sólo 30-40 transmiten el *Plasmodium* spp. en la naturaleza (33). El resto no puede mantener el desarrollo del parásito que produce la malaria. El mosquito macho no pica al humano y no puede transmitir el parásito que causa la malaria. Este mosquito se alimenta del néctar de las plantas u otras fuentes de azúcares, a comparación del mosquito hembra adulta que necesita la sangre del humano para poder madurar sus huevos (33).

Existen cuatro subgéneros de mosquitos conocidos implicados en la transmisión de la malaria, entre estos se encuentran: *Anopheles*, *Cellia*, *Kerteszia* y *Nyssorhynchus* (33). En varios casos se ha reportado especies muy emparentadas genéticamente de los vectores del género *Anopheles*, como por ejemplo *A. gambiae*, el vector más prevalente que causa la malaria en África sub-sahariana, el cual consiste de al menos siete especies morfológicamente indistinguibles (33).

En la Amazonía Peruana, uno de los vectores que transmite la malaria es el mosquito hembra de la especie *An. darlingi*, también se reportó la presencia de *An. benarrochi*, distribuida en la parte oeste de Loreto y Ucayali; pero los autores sugieren que este vector presenta menor competitividad comparado con *An. darlingi* (34) debido a la baja probabilidad de ser infectado por *P. vivax* y *P. falciparum* en ensayos de infecciones experimentales.

Trabajos realizados en las localidades rurales de Iquitos, que incluyen estudios sobre el comportamiento del mosquito, los cuales fueron colectados entre el 2011 y 2012, evidenciaron que el mosquito picaba con mayor frecuencia fuera de las casas y a tempranas horas de la mañana (25); sin embargo mosquitos colectados durante 2013 y 2015 evidenciaron lo contrario, es decir una mayor proporción de mosquitos que picaban dentro de las casas (35). Por último, utilizando métodos moleculares para determinar las preferencias alimenticias de mosquitos colectados en las comunidades de Mazan y Napo se encontró que la sangre humana fue la más común en el estómago del mosquito, seguido de sangre de galliformes y vacas (36). En

conclusión, el comportamiento de *Anopheles darlingi* presenta alta plasticidad y es generalmente antropofílico (35).

2.6 Características de las infecciones asintomáticas y submicroscópicas causadas por *P. vivax*

P. vivax es una especie que presenta características biológicas muy particulares y las infecciones causadas por esta especie producen episodios que se caracterizan por ser asintomáticos y con bajas densidades parasitarias, es decir producen infecciones submicroscópicas (37). Las infecciones asintomáticas son aquellas infecciones donde los pacientes no muestran los síntomas clínicos característicos de la malaria y por tanto no buscan atención médica, lo que conlleva a que este tipo de infecciones pasen desapercibidas a las diferentes estrategias de control desplegadas por el MINSA (38); sin embargo, esta definición todavía se encuentra en discusión, debido a que muchos estudios utilizan diferentes criterios para definir a los asintomáticos como tales. Por ejemplo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) define una infección asintomática de *Plasmodium* spp. como la presencia asexual del parásito en la sangre sin ningún síntoma de la enfermedad (39), otros autores lo definen como ausencia de fiebre o temperatura (40). Sin embargo, en estudio de investigación desarrollados en Tailandia y Kenia definieron a un asintomático como la ausencia de episodios febriles, auto reporte de fiebre o tratamiento antimalárico antes y después de la fecha del estudio (41,42).

Por otro lado, Según Ramirez-Olivencia (43), define a las infecciones submicroscópicas como aquellas que presentan bajas densidades parasitarias, que

son indetectables por microscopia convencional, y que no necesariamente producen gametocitos (44). Muchos estudios han revelado la carga de las infecciones submicroscópicas en diferentes escenarios de transmisión. Por ejemplo, en dos ciudades de la India encontraron entre un 3.6% y 70.8% de este tipo de infecciones, y estaban asociadas a la época de lluvias y se presentaba en su mayoría en individuos menores de 15 años (45). Otro estudio mostró que las infecciones submicroscópicas fueron persistentes y oscilantes en Vietnam durante el 2010 al 2015 (46), y en Indonesia reportaron 65.2% de infecciones submicroscópicas causadas por *P. vivax* (47). Pero esta cantidad de infecciones submicroscópicas pueden variar en los diferentes continentes donde esta especie es endémica estableciendo escenarios micro-epidemiológicos característicos. Por ejemplo, en Colombia que presenta una baja intensidad de transmisión, las infecciones submicroscópicas, variaron entre un 3% al 20% (48). Sin embargo, en cuatro comunidades de la cuenca del Mazan en la Amazonia Peruana, cuyo escenario de transmisión es similar a Colombia, se encontró un 85% de infecciones submicroscópicas causadas por *P. vivax* (4), este porcentaje es contrastante con lo encontrado en Lupuna y Cahuide, cuya proporción de infecciones submicroscópicas fue de 0.8% en Lupuna, en época de creciente del río, y 0.9% en Cahuide en épocas de vaciante del río (6).

2.7 Genética y genómica poblacional de *P. vivax*

La diversidad genética es la variación de las características heredables presentes en una población de una especie y sirve como una forma para que esta se adapte a los cambios ambientales (49). Una población es un grupo de individuos de la misma

especie que viven dentro de un área geográfica suficientemente restringida y que cualquier miembro puede potencialmente aparearse con cualquier otro miembro del sexo opuesto (50).

Un gen puede aparecer en muchas formas o estados. Estas alternativas o estados de un gen son llamados alelos. El grupo de genes presentes en un individuo constituye su genotipo. La expresión física o bioquímica del genotipo es llamado fenotipo (51).

El genoma de *P. vivax* está compuesto por 14 cromosomas, dentro de este genoma podemos encontrar secuencias complejas como los microsatélites. Los microsatélites son secuencias pequeñas repetidas en tándem o motivos, por ejemplo, AAT, AAT, AAT; en esta ocasión es un microsatélite cuyo motivo es trinucleótido (AAT). Adicionalmente, estas secuencias son conocidas como marcadores moleculares que se caracterizan por ser neutrales, es decir no están en zonas bajo presión de selección; son codominantes, es decir se observan los alelos de ambos progenitores (52). Sin embargo, *P. vivax* por ser haploide solamente se puede observar un alelo. Los microsatélites también son polimórficos, su polimorfismo radica en la adición o deleción del motivo incrementando o disminuyendo el tamaño del microsatélite respectivamente (51), estos microsatélites son útiles para genotipificar a los parásitos que causan la malaria y realizar estudios de genética poblacional.

Existen diferentes índices para evaluar la genética de poblaciones. Por ejemplo, la Heterocigocidad esperada (H_e), establecida por Nei y colaboradores 1973 (53), como la diversidad genética, su cálculo radica en las frecuencias alélicas

encontradas. Otro índice importante es el Desequilibrio de Ligamiento (DL), que es la asociación no aleatoria de alelos en dos o más loci y se calcula como $D_{AB} = P_{AB} - P_A P_B$ (54). Una medida de resumen del DL es el Índice de Asociación Estandarizada. El incremento del DL se produce por varias razones, una de estas es la asociación física de loci en un mismo cromosoma, el siguiente es el apareamiento entre clones genéticamente similares, que incrementa la autogamia en la población y en consecuencia el aumento de la clonalidad (55). Una manera de disminuir el DL es mediante la recombinación genética que se lleva a cabo dentro el mosquito vector de la malaria.

Otro índice utilizado es el número de alelos efectivos (N_e), que son los alelos que se van a segregar a la siguiente generación (después de una generación) durante la reproducción. La Tasa Mutacional Poblacional (θ), permite conocer cuantas mutaciones nuevas se generan por cada generación del parásito. Esta métrica es dependiente del número de alelos efectivos poblacional (N_e) y la tasa de mutacional de *P. vivax* cuyo valor es $\mu = 5.31 \times 10^{-3} / 3.77 \times 10^{-2}$. La manera de calcular $\theta = N_e \times \mu$ (56,57). En consecuencia, estas métricas nos permiten hacer inferencias sobre la población del parásito y los cambios que ocurren en ellos producto de varios eventos evolutivos.

La Multiplicidad de Infección (MOI) es el promedio de parásitos genéticamente diferentes que están presentes en una infección. Este es un indicador de intensidad de transmisión, es decir mayor MOI mayor intensidad de transmisión y viceversa. Las infecciones multiclonales pueden ser el resultado de picaduras independientes

de mosquitos infectados (llamado super infección) o una simple picadura de mosquito trasmite el inoculo de esporozoitos genéticamente diversos (58). En el caso de *P. vivax*, las infecciones multiclonales pueden ser producidas por hipnozoitos alojados en el hígado. Por último, el índice de Simpson es una métrica de riqueza utilizada en ecología que también mide la diversidad de una especie.

La estructuración poblacional es otra forma de evaluar las poblaciones de *P. vivax*. Una de esas métricas es el F_{st} de Wright, el cual mide la diferenciación poblacional. Este parámetro tiene un valor de 0 a 1. Un valor de cero o muy cercano a este indicaría ausencia o poca diferenciación poblacional, y cuando el valor es más cercano a 1, significa una mayor diferenciación poblacional (51,59). Sin embargo, su valor máximo (cercano a 1) se ve afectado, porque en su cálculo utiliza los valores de diversidad genética intrapoblacional (H_s) y la frecuencia alélica que se sobreestima cuando se usan microsatélites muy polimórficos (alelos más frecuentes) (59). Sin embargo, para superar este sesgo producido por el F_{st} de Wright se puede utilizar la diferenciación poblacional de Jost (D_{Jost}) o el F_{ST} de Jost, el cual no tiene una dependencia de diversidad intrapoblacional (H_s), por tanto no se ve afectado en su máximo valor (59) y puede ser usado para marcadores como los microsatélites.

El Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA), es otra métrica que también permite evaluar la diferenciación genética entre poblaciones. El AMOVA se basa en modelos empíricos, es decir se debe conocer previamente las fuentes de variación (estructura jerárquica), estos modelos utilizan distancias euclidianas (0 y 1) para estimar la diferenciación (60). El AMOVA puede ser medido en el paquete PopR in

R Studio. Para evaluar si existe estructuración poblacional, se puede usar el programa *Structure*. Este programa usa estadística bayesiana y cadena de Markov Montecarlo, para estimar la probabilidad de asignar un individuo a una población (61).

Se han realizado muchos trabajos de genética de poblaciones de *P. vivax* a nivel mundial. Por ejemplo, un trabajo desarrollado en China central usando siete microsatélites encontraron alta diversidad genética ($H_e=0.8-0.85$), con la presencia de diferenciación poblacional ($F_{st}=0.10$) y una estructuración poblacional con poblaciones clonales que fluctúan entre 4 a 10 (62). Adicionalmente, un panel de 11 microsatélites evidenció la diversidad genética de parásitos colectados en diferentes continentes. Por ejemplo, en el Sureste de Asia se encontró una alta diversidad genética observada en la riqueza alélica (10.0-12.4), mediana diversidad en el Pacífico Sur (8.1 -9.9), Madagascar y Sudán (7.9-8.4); pero baja diversidad en América del Sur y Asia Central (5.5 -7.2). También en este mismo estudio se observó una estructuración poblacional en estos continentes y una moderada a alta diferenciación poblacional dentro y entre continentes (63). En la Amazonía Peruana, dos estudios encontraron resultados similares usando de 14 a 16 microsatélites y muestras colectas el 2008 y del 2013 al 2015 en diferentes comunidades, estos resultados mostraron poblaciones clonales estructuradas geográficamente, con una moderada a alta diversidad genética con presencia de flujo genético entre comunidades distantes geográficamente (7,64,65).

Actualmente, la tecnología del secuenciamiento de segunda y tercera generación ha permitido realizar estudios a escala más fina de la genómica poblacional. En ese sentido podemos mencionar a diferentes plataformas de secuenciamiento del genoma, como por ejemplo SOLiD, Nanopore, PacBio y Illumina (66). Este último usa la metodología de secuenciamiento por síntesis con terminadores reversibles. Tiene la ventaja generar *reads* (secuencias de ADN) de alta calidad, cuyos tamaños fluctúan entre 36-300pb, así como su bajo costo comparado con PacBio y Nanopore que generan *reads* de mayor tamaño (10Kb), y son usadas en su mayoría para ensamblaje de genomas de referencia (67). Adicionalmente, en la tecnología de Illumina, las reacciones se repiten durante 300 o más rondas, el uso de un marcador fluorescente aumenta la velocidad de detección gracias a la imagen directa, en contraste con las imágenes basadas en cámaras. El Miseq de illumina proporciona 7,5 Gb de datos que contiene 25 millones de *reads*/por corrida a 2 X 150bp *reads*, y puede realizar el secuenciamiento del doble de tamaño en pb es decir, 2 X 300bp, para una producción de 15 Gb de datos (68). En consecuencia, esto lo convierte en una herramienta ideal para secuenciar genomas de *P. vivax*.

El uso de la plataforma Illumina varía en sus aplicaciones. Por ejemplo, se puede utilizar en la vigilancia genómica de parásitos para detectar aparición de resistencia a drogas antimaláricas, búsqueda de huellas de selección, generación de paneles de SNPs para genotipificar e identificar las relaciones genéticas entre parásitos y relacionar la intensidad de transmisión con la métricas genómicas (66,68–70).

Dentro de los análisis de diferenciación poblacional con datos genómicos podemos mencionar el Análisis de Componentes Principales (ACP) (PCA por sus siglas en Inglés), que es un análisis multivariado que reduce la complejidad de los datos mientras se preserva la covarianza de los datos. El principal objetivo es investigar los principales ejes de variación de un conjunto de datos, siendo cada eje independiente del siguiente (es decir no debe haber correlación entre ellos). En el contexto de los datos alélicos, el ACP resume los ejes principales de variación en las frecuencias alélicas y luego produce las coordenadas de los individuos a lo largo de estos ejes (71,72).

Otro análisis con datos genómicos, son las relaciones genéticas entre individuos dentro de una población, estas relaciones pueden evaluarse a través de la identidad por descendencia (IBD) compartida. Esta medida permite evaluar si dos individuos provienen de un ancestro en común o el parentesco entre dos individuos. Este análisis utiliza la tasa de recombinación del parásito, 13.5Kb por centiMorgan (cM), es decir SNPs separados cada 13.5Kb tienen en promedio de cruce cromosómico el 1% por generación (73), este evento ocurre más rápido que una mutación y la deriva génica. Por lo tanto, la IBD mide los acontecimientos demográficos más recientes de una población en comparación con el F_{st} , que usa la frecuencia alélica y la mutación presente (73). Un algoritmo ha sido elaborado en el paquete isoRelate en R para determinar el IBD y ha sido validado con data de secuenciamiento simulado de *P. falciparum*. Este algoritmo detecta SNPs bi-alélicos en IBD hasta en 2cM del

genoma con gran exactitud y sobre todo en infecciones policlonales con una probabilidad del 80% que ellos sean reales (74).

Los árboles filogenéticos son diagramas que representan las relaciones genéticas evolutivas entre organismos, es decir que ayudan a predecir el ancestro en común más cercano entre estos, así como su direccionalidad evolucionaria o simplemente para representar grupos de secuencias relacionadas entre individuos (75). Para poder analizar este último, podemos usar arboles sin raíz que se caracterizan por mostrar la topología del árbol y no la direccionalidad de la evolución. Los métodos más comunes para construir estos árboles son los basados en distancia y los de caracteres. Entre los métodos basados en distancia puede mencionarse a los de UPGMA y Neighbor Joining (NJ) (76). El método de NJ sirve para construir árboles sin raíz y se basa en una matriz de distancia, y la naturaleza de las ramas del árbol son elaborados a base de distancias aditivas. Adicional a esto, el método de NJ considera el *ratio* mutacional cuando construye el árbol y asume que las mutaciones no son constantes, por tal motivo se considera un método más confiable a comparación del UPGMA. Por otro lado, el objetivo de un árbol NJ es explicar la cantidad mínima de evolución necesaria para explicar diferencias entre los individuos, esto se elabora en base al método de evolución mínima (76). Por lo tanto, debido a estas características el método de NJ es ideal para evaluar las relaciones genéticas de *P. vivax*.

La información genómica ha permitido estudiar la dinámica de la transmisión, las relaciones genéticas y la importación de infecciones producidas por *P. vivax* a nivel

temporal y espacial. Por ejemplo un estudio realizado en Malasia y las frontera entre China y Myanmar durante el 2018 y 2020 revelaron la aparición de brotes e infecciones predominantemente clonales, y parásitos que derivaban de un ancestro en común (IBD>0.90), y estos se agrupaban de acuerdo a su origen geográfico (77,78). También estudios con datos de genomas han permitido integrar la información de historia de viaje y el rastreo de infecciones importadas como lo reportado en Panamá (79).

Los estudios genómicos realizados en Sudamérica durante el 2020 y 2023, permitieron observar huellas de presión de selección en el genoma de *P. vivax*, así como la presencia de genes de resistencia como el *pvm₁dr1*, y el origen geográfico en muestras colectadas en Perú, Brasil y Colombia comparado con muestras del continente Asiático (80,81), así como cuatro poblaciones ancestrales (Brasil, Perú, Panamá y México/Colombia) (80), y la conectividad inter países (69). Por lo tanto, las herramientas genómicas y la gran cantidad de data generada están abriendo un abanico de posibilidades para mejorar la comprensión de la epidemiología, la genómica poblacional y la dinámica de la transmisión de *P. vivax*. Por último, permitirán informar y extrapolar la información obtenida para mejorar los recientes planes de control y eliminación de la malaria.

III. JUSTIFICACIÓN

La malaria continúa siendo un problema de salud pública a nivel de todos los países tropicales. La OMS propuso a los 90 países endémicos para malaria en el mundo, incluido el Perú, el reto de eliminar la malaria a nivel regional, nacional y global hasta llegar a su erradicación.

Durante el desarrollo del programa PAMAFRO (2007-2011) se observó una cifra histórica de disminución de casos, llegando hasta las 11 mil infecciones en el 2011 (82). Al terminar este programa, el MINSA se limitó solamente a identificar y tratar los casos en zonas cercanas y con intervenciones intermitentes en áreas más alejadas. Esta falta de continuidad, y sumado a esto las inundaciones severas que ocurrieron en la Amazonia Peruana el 2012, impidieron que se logre el objetivo de eliminar la malaria. Como consecuencia de esto, los casos de malaria fueron en aumento llegando a más de 60 mil el año 2014 (3).

El programa Amazonía – ICEMR inició sus actividades el año 2012, ejecutando una serie de proyectos en comunidades cercanas a Iquitos, producto de esto se observó una transmisión heterogénea espacio-temporal ligada a factores socio-demográficos específicos caracterizando diversos contextos micro-epidemiológicos con altas prevalencias de infecciones submicroscópicas, además de identificar a la movilización humana como otro posible factor de riesgo para mantener la transmisión (4,5,6,7,8). Sin embargo, no se logró esa caracterización a profundidad en comunidades remotas, además que tampoco se identificó de manera fehaciente el rol de la movilización humana en el traslado de parásitos de una

comunidad a otra y su implicancia en la transmisión. Por lo tanto, este estudio se enfocará en esta problemática utilizando la genética y genómica de poblaciones y sus métricas de manera complementaria a las métricas epidemiológicas para lograr una mejor comprensión de la heterogeneidad de la transmisión e identificar otro escenario micro-epidemiológico en comunidades remotas como Santa Emilia, y del mismo modo obtener información sobre la presencia de clones de parásitos con la capacidad de una mayor adaptación para expandirse dentro de la población parasitaria local, lo cual sería un indicio de alguna ventaja adaptativa (clonas con nuevas variantes antigénicas o resistentes a drogas). Por otro lado, estudiar el rol de movilización humana en las comunidades como Libertad y Urcomiraño, nos permitirá confirmar el rol de los viajeros para mantener la transmisión a través de la introducción de nuevos parásitos, genéticamente diferentes, siendo estos últimos relevantes ya que pueden hacer resurgir la malaria en comunidades en vías de eliminación.

Esta información es relevante para mejorar el plan actual de eliminación de la malaria en el Perú (84) y conseguir su erradicación, debido a que esta información ayudará a mejorar o diseñar nuevas estrategias de control enfocándose en las infecciones submicroscópicas mediante el uso de herramientas de diagnóstico más sensibles y métodos moleculares para la vigilancia de las poblaciones parasitarias con énfasis en estas poblaciones móviles.

IV. OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar molecularmente las infecciones de *P. vivax* que contribuyan a mantener la transmisión de la malaria y definan el estado micro-epidemiológico de las comunidades de Santa Emilia, Libertad y Urcomiraño que se encuentran en vías de eliminación de la malaria.

CAPÍTULO 1

EVALUACIÓN DE LA PREVALENCIA, DIVERSIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURACIÓN POBLACIONAL DE *Plasmodium vivax* DURANTE LA VIGILANCIA DE CASOS EN LA COMUNIDAD DE SANTA EMILIA.

I. INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad y un problema de salud pública en todos los países tropicales. En el año 2021 se han producido 247 millones casos de malaria en todo el mundo (1). En el Perú, según el Ministerio de Salud (MINSa), hasta Diciembre del año 2023 se han reportado más de 22 mil casos, y dentro de la Amazonía Peruana se reportó el 91% de estos casos, y el 84.37% fueron causados por *Plasmodium vivax* (85). Por lo tanto, hasta la fecha la malaria continúa deteriorando la calidad de vida de las personas que sufren esta enfermedad.

Estudios desarrollados en China, Malasia, Tailandia, Armenia, Sudán y América del Sur, evidenciaron la complejidad de las poblaciones genéticas de *P. vivax*, mostrando su alta diversidad genética, un alto desequilibrio de ligamiento, propagación clonal, y una población estructurada geográficamente, pese a la baja intensidad de transmisión, (63,86–89) y el desconocimiento de los reservorios que mantienen esta compleja población de *P. vivax*.

Dentro de la Amazonía Peruana, las comunidades asentadas a lo largo de los ríos aún mantienen la transmisión de la malaria como, por ejemplo, Lupuna y Cahuide. Estudios realizados en estas dos comunidades evidenciaron que la población de *P. vivax* tenía moderada diversidad genética, un significativo desequilibrio de ligamiento y estaban conectadas geográficamente (7). Adicionalmente, la presencia de infecciones asintomáticas y submicroscópicas (6) que no son detectados por los métodos de diagnóstico estándar utilizados por el MINSA (microscopia), y que no permiten identificar a estos posibles reservorios de la transmisión.

El problema de la malaria se acentúa aún más en comunidades remotas o alejadas a los centros de salud, donde hay poca o nula intervención del MINSA para controlar esta enfermedad, y eventualmente eliminarla. Santa Emilia, es una comunidad remota que carece de recursos sanitario básicos, donde la población de parásitos mantiene una moderada diversidad genética que no cambió durante el 2013 (7,90). Esta vigilancia fue realizada por el programa “Centro Internacional de Excelencia en Investigación en Malaria de la Amazonía (Amazonia-ICEMR, por sus siglas en Inglés) para identificar y caracterizar molecularmente las infecciones por *Plasmodium spp.* en esta comunidad, posteriormente se retomó la vigilancia del 2015 al 2016. Sin embargo, no se llegó a caracterizar la micro-epidemiología de la malaria durante este tiempo, a pesar de haberse sugerido previamente que el flujo genético de parásitos podría estar asociado a la movilización humana (7). Con el objetivo de evaluar si las infecciones submicroscópicas contribuyen a mantener la transmisión local, se planteó determinar la prevalencia de las infecciones microscópicas y/o submicroscópicas de *Plasmodium*

spp., evaluar la diversidad genética, determinar la presencia de un reciente cuello de botella poblacional y los cambios temporales de las poblaciones de parásitos circulantes de *P. vivax* mediante un análisis de estructuración poblacional y las relaciones genéticas a través de una red de expansión de haplotipos, la información generada permitirá complementar la información epidemiológica local.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar la prevalencia, diversidad genética y cambios demográficos de las infecciones producidas por *Plasmodium vivax* en la comunidad remota de Santa Emilia durante la vigilancia de casos entre el 2013 y 2015-2016 y definir su estado micro-epidemiológico.

Objetivos específicos

- Determinar la prevalencia de infecciones submicroscópicas de *Plasmodium* spp. mediante PCR en tiempo real durante los años 2015 -2016 en la comunidad de Santa Emilia y su posible rol para mantener la transmisión.
- Evaluar la diversidad genética y estructuración poblacional de los parásitos de *P. vivax* que circularon en la comunidad de Santa Emilia durante los años 2015 -2016 y compararlas con el año 2013.
- Evaluar los cambios demográficos mediante una prueba de cuello de botella y el reemplazo de parásitos a través una red de expansión de haplotipos en las infecciones producidas por *P. vivax*.

III. METODOLOGÍA

3.1 Área de estudio y población

Este trabajo se desarrolló en la comunidad de Santa Emilia (-467498 N, -8260914 E), que se encuentra ubicada en la quebrada Nahuapa, que pertenece al distrito de Nauta (-502966N, -8186227), provincia de Loreto y departamento de Loreto. Para acceder a esta comunidad primero se debe ir a la ciudad de Nauta que se encuentra a 2 horas de la ciudad de Iquitos, esto se debe hacer a través de la carretera Iquitos-Nauta. Segundo, se debe navegar desde Nauta hasta Santa Emilia por el río Tigre aproximadamente 10 horas (ver figura 2). Por otro lado, esta comunidad no cuenta con recursos sanitarios básicos como electricidad, agua potable y desagüe. La agricultura y pesca son sus principales actividades económicas, y por último el único centro de salud se encuentra en la ciudad de Nauta donde las personas deben navegar varias horas para ser atendidas cuando están enfermas.

Se invitó a participar a los pobladores de la comunidad de Santa Emilia en este estudio, después de aceptar y firmar el consentimiento informado aprobado por el comité de ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia a través del proyecto Amazonia-ICEMR (“Transmisión de la malaria en comunidades lejanas de la región Amazónica del Perú – Fase II – código SIDISI 64024), se les incluyó en el estudio.

Durante los años 2013 y 2015-2016, el proyecto Amazonia-ICEMR realizó la vigilancia mensual y semanal mediante búsqueda activa de individuos infectados con *Plasmodium spp.* en la comunidad de Santa Emilia. Finalmente, según la OMS define

la vigilancia epidemiológica como la búsqueda de casos mediante la vigilancia activa con el objetivo de recolectar datos, analizar e interpretar la información generada en una población para informar a las autoridades decisoras de salud, para la prevención y control de la malaria.

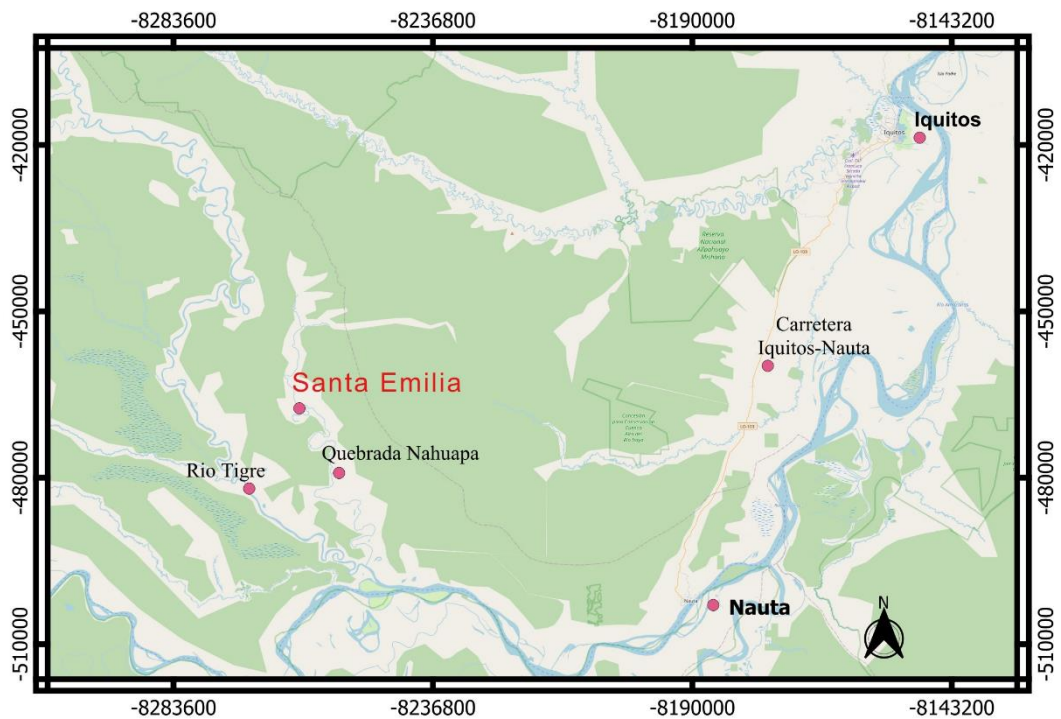


Figura 2: Lugar de estudio. El mapa indica la ubicación geográfica de la comunidad de Santa Emilia, ubicada en el distrito de Nauta, provincia de Loreto.

3.2 Criterios de exclusión e inclusión de muestras biológicas

Criterios de exclusión:

- Muestras con infecciones mixtas o positivas a *P. falciparum* fueron excluidas para el análisis de las métricas de diversidad genética.

- Muestras negativas luego del re-diagnóstico.
- Muestras con parasitemias menor a 1-5 mol/ μ L o los que presentaron Ct mayor a 33, se excluyeron de los análisis de diversidad genética.

Criterios de inclusión

- Muestras positivas a *P. vivax* para los análisis de métricas de diversidad genética.
- Muestras con parasitemias mayor a 1.5mol/ μ L.

3.3 Diseño de estudio

Este estudio es del tipo retrospectivo, longitudinal y descriptivo. Se colectaron muestras de sangre capilar impregnada en papel filtro y lámina portaobjeto, durante los años 2015 y 2016, para el diagnóstico molecular mediante la PCR en tiempo real y microscopia, respectivamente. Las muestras fueron colectadas mediante barridos mensuales en toda la comunidad y seguimientos semanales (detección activa de casos). De forma simultánea se aplicaron encuestas epidemiológicas a cada individuo durante los barridos y a los que presentaron síntomas, tal como se observa en el diseño de estudio (figura 3).

En el año 2013 el proyecto Amazonia-ICEMR realizó la misma vigilancia de casos en Santa Emilia, debido a que previamente mostraron un Índice Parasitario Anual (IPA > 20%) y las intervenciones intermitentes por parte del MINSA. Se tomaron muestra de sangre capilar en papel filtro y lamina. Se registraron datos sociodemográficos, y se realizó la genotipificación de las muestras positivas a *P. vivax*, los resultados de este

primer año fueron publicados el año 2019. En total se tienen 139 muestras genotipificadas en ese estudio, y que fueron incluidas en esta tesis para un análisis posterior que permita realizar las comparaciones con las poblaciones genéticas encontradas en el período 2015-2016.

Los individuos con resultado positivo a *Plasmodium* spp. detectados por microscopía recibieron tratamiento supervisado según la norma técnica utilizada por el MINSA (91). Por otro lado, el diagnóstico molecular se realizó luego de la culminación del estudio, los individuos con resultado positivo a la PCR en tiempo real no recibieron tratamiento.

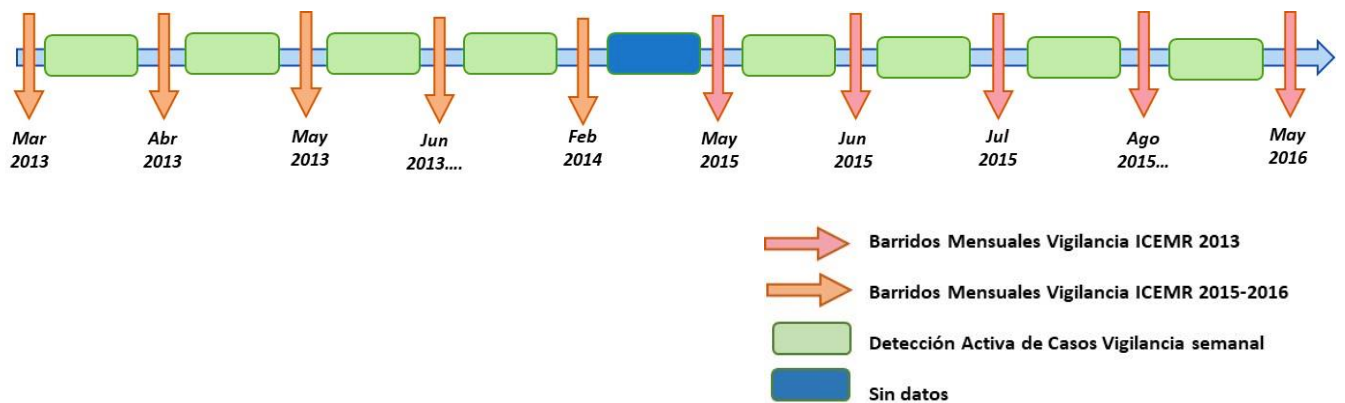


Figura 3: Diseño del estudio para la colección de datos y muestras en Santa Emilia.

3.4 Diagnóstico microscópico y molecular de *P. vivax*

Para el diagnóstico microscópico, se utilizó el protocolo propuesto por el MINSA (92), que consistió en fijar la gota gruesa con metanol puro y teñir las láminas con el reactivo de Giemsa. El diagnóstico microscópico fue realizado mientras se desarrollaba la vigilancia de casos.

Se realizó el diagnóstico molecular de 3,434 muestras colectadas en papel filtro, después de haber terminado la vigilancia de casos durante el 2015 y 2016. El aislamiento del ADN genómico fue realizado tomando un área aproximada de 6mm² de papel filtro, se utilizó el Mini Kit E.Z.N.A Blood DNA kit (OMEGA Bio-tek USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante, el ADN final fue eluido en 50 µL de buffer de elución. Se utilizó como control positivo una muestra de ADN de *P. falciparum* proveniente de cultivo y como control negativo el ADN de una muestra de un paciente sin malaria. Para los controles de la PCR en tiempo real se usaron el ADN de muestras de pacientes con altas parasitemias de *P. vivax* y *P. falciparum*.

Esta actividad fue llevada a cabo en el Laboratorio de Malaria de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Para la amplificación del ADN se realizó la PCR en tiempo real y se utilizó el protocolo propuesto por Mangold y colaboradores (93). La diferenciación de la especie de *Plasmodium* spp. se realizó mediante el análisis de la temperatura de melting. Se seleccionaron las muestras positivas a *P. vivax* para la genotipificación.

3.5 Genotipificación y electroforesis capilar de *P. vivax*

La cuantificación de las muestras se realizó en base a una curva de plásmidos que tenía insertado el gen ARNr 18S, el cual se utilizó como blanco de diagnóstico, esto fue modificado de acuerdo a protocolo propuesto por Mangold y colaboradores (93). Previo a la genotipificación, las muestras fueron categorizadas en base al nivel de parasitemia (moléculas/ μ L). La categoría 1 incluía las muestras con una parasitemia >24 mol/ μ L, la categoría 2 estaba conformada por las muestras con una parasitemia entre 4 - 24 mol/ μ L, en la categoría 3 estaban las muestras con parasitemia entre 1.5 – 4 mol/ μ L y la cuarta categoría incluían las muestras con parasitemia menor a 1.5 mol/ μ L. Las muestras de la categoría 1, fueron diluidas hasta 8 moléculas/ μ L, la categoría 2 pasaron por el proceso de amplificación genómica, para esto se utilizó el protocolo propuesto por Cowell (94), esto se hizo con el propósito de enriquecer el genoma de manera aleatoria y para aumentar la probabilidad de genotipificar la muestra. Por último, las muestras que pertenecieron a la categoría 3 se les volvió a extraer el ADN (se utilizó otra pieza de la muestra en papel filtro).

En total, 240 muestras seleccionadas fueron genotipificadas con 16 marcadores microsatélites propuestos por Kurunawerna (95), Imwong (96) y Manrique (7). Las secuencias de los microsatélites y las condiciones de amplificación se detallan en el anexo 1.

Terminado este proceso se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 2%, para evidenciar la amplificación de los microsatélites. Se enviaron 240 muestras a la

empresa SOMAGEN para el servicio de electroforesis capilar. Los electroferogramas generados durante la electroforesis capilar y los alelos encontrados fueron revisados usando el programa Peak Scanner v.10.

De estas 240 muestras genotipificadas, solo 221 amplificaron más del 63% de todos los loci, adicionalmente a estas muestras se incluyeron 139 más que fueron previamente genotipificadas y publicadas tal como se mencionó en el diseño de estudio (7).

El flujograma para la selección de muestras donde se incluyen los criterios de exclusión e inclusión se puede observar en el anexo 2, en total se usaron 360 muestras para realizar el análisis de la diversidad genética.

3.6 Análisis de datos

La base de datos de los alelos encontrados en las muestras fueron generados usando Microsoft Excel, los alelos encontrados fueron seleccionados en base a la metodología desarrollada por Alarcón (97). Se utilizó el programa estadístico R y R Studio para evaluar las métricas de diversidad genética. La diversidad genética fue medida en base al índice de Nei ($He = 1 - \sum p_i^2$) (53). Para este estudio se definió una diversidad genética baja cuando el $He < 0.1$, moderada cuando los valores de He se encuentre entre los rangos $0.1 < He < 0.5$ y una alta diversidad genética cuando los valores de $He > 0.5$. El número de alelos efectivos fue calculado invirtiendo la medida de homocigocidad en un locus en cada población. El desequilibrio de ligamiento (DL) fue medido como la autogamia de la población. El índice de asociación estandarizada (I_A^s) fue usado como una medida de resumen del DL. Se usó los haplotipos únicos (LD con corrección

clonal (cc) – LD sin cc) para evitar falsa autogamia debido a la población clonal. La significancia del (I_A^S) fue estimada usando 1000 permutaciones aleatorias de los datos, estos análisis fueron realizados usando el paquete poppr implementado en R. La tasa (ratio) mutacional poblacional (θ) fue realizado en el paquete pegas en R. Para comparar la diversidad genética obtenida por cada año de muestreo se realizó la prueba de Montecarlo y la significancia estadística (p-valor < 0.05). Adicionalmente, se realizó la prueba de Kruskal Wallis para comparar las mediciones de las otras métricas de diversidad genética a través del tiempo.

La multiplicidad de infección (MOI) se definió como la presencia de uno o más alelos en el mismo locus genético. El promedio de MOI fue calculado como un ratio del total del número de fragmentos distintos (clones de parásitos genéticamente distintos) evaluados por un locus dado en relación al número de locus amplificados por marcador (98). La policlonalidad fue definida si al menos dos alelos eran diferentes en la misma infección.

Para evaluar recientes cambios demográficos (efecto de cuello de botella) en la población, se utilizó el programa Bottleneck v 1.2.02 (99), se aplicó la prueba de Wilcoxon para determinar el exceso o déficit de heterocigotos, y la estimación de la heterocigocidad esperada en el equilibrio poblacional usando 10000 interacciones. Se utilizaron dos diferentes modelos mutacionales: el modelo de un solo paso (SMM por sus siglas en inglés) y el de dos fases (TPM por sus siglas en inglés), esto se realizó con 13 microsatélites del tipo perfecto.

La diferenciación poblacional fue medida en base al F_{st} propuesto por Jost ($H_t - H_s / 1 - H_s$) (59). Donde H_t es la Heterocigocidad total en todas las poblaciones combinadas y H_s es la heterocigocidad promedio dentro de las poblaciones. Este índice no se ve afectada por el tamaño de muestra. Su cálculo se realizó en el paquete `mmod` (100) implementado en R. Para este estudio no se definió si un F_{st} es alto, moderado o bajo porque los valores obtenidos por el F_{st} de Jost no son comparables con la guía cualitativa para la interpretación del F_{st} establecido por Wright.

El Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA) se aplicó para determinar las fuentes de diferenciación poblacional usando el paquete “`ade4`” en R (101). La significancia estadística del índice de fijación (ϕ) fue calculado usando 10000 permutaciones. Para determinar la estructuración poblacional presente en el área de estudio, se utilizó el Programa Structure v 2.3, el programa fue corrido bajo el modelo de ancestría Admixture debido a la ausencia de un completo aislamiento del parásito y un posible intercambio genético en el tiempo con otros lugares. Se usaron 10 réplicas por cada valor de K (de 1 a 10) con un *burning* de 50000 como un tiempo de entrenamiento previo para ajustar modelo asignado, y para determinar las posibles asignaciones de individuos a cada grupo se usó la cadena de Marco Montecarlo de 200000 repeticiones, Para determinar el ΔK más probable (número de poblaciones más probables) se usó el principio de Evano (102) implementado en el programa Structure Harvester (103). La visualización gráfica de las poblaciones y el coeficiente de ancestría fueron realizados con el programa CLUMPAK (104).

Se utilizó el programa Admixture (105) para evaluar la estructuración poblacional en base a los datos de SNPs, previamente los datos de los genotipos fueron filtrados por el programa PLINK, en el formato ped. Se analizaron de 1 a 10 clusters, con 1000 bootstraps, un valor de 10 cross-validations y 10 interacciones. Se usó el programa CLUMPAK para la visualización de los resultados de ancestría. Para determinar el número de clusters más probable se graficó en el programa R los valores de error del *cross-validations* que se obtiene del programa Admixture cuando simula cada cluster indicado (1-10), los valores más bajos del error del *cross-validations* indica el cluster más probable o el número de poblaciones más probables.

Por último, las relaciones genéticas entre los haplotipos fue medida en base a distancia genética de Bruvo, esta distancia fue usado debido a que toma en cuenta la ocurrencia de múltiples pasos mutacionales de los microsatélites (es decir, mutaciones que no cambian un alelo a otro en un solo paso, sino que pasan por varios intermediarios). Por otro lado, identifica las diferencias mutacionales entre los alelos correspondientes a dos individuos, luego compara todas las combinaciones posibles de los alelos que pueden estar presente en un locus para encontrar la distancia mínima y por último promedia la distancia para cada locus para obtener la distancia genética total entre dos individuos. Esto fue evaluado en el paquete poppr en R Studio.

IV. RESULTADOS

4.1 Prevalencia de infecciones submicroscópicas de *P. vivax* detectados por PCR en tiempo real durante el 2015 y 2016.

Se encontró una prevalencia total de malaria del 36% y el 30% de *P. vivax* detectada por microscopía. Por otro lado, la prevalencia total de malaria encontrada por PCR en tiempo real fue de 84% y la prevalencia de *P. vivax* fue del 56% (ver anexos 3 y 4). La prueba exacta de Fisher mostró que existen diferencias estadísticamente significativas (p-valor <0.05) entre la prevalencia total de malaria detectada por PCR en tiempo real a comparación de la encontrada por microscopía, del mismo modo ocurrió entre la prevalencia de *P. vivax* detectada por PCR en tiempo real y por microscopía (p-valor < 0.05).

Por otro lado, se observó el incremento de 50% al 75% de infecciones submicroscópicas que se ha mantenido durante el año 2015 y 2016 tal como se observa en la figura 4. Se encontró una prevalencia del 48% de infecciones submicroscópicas causadas por *P. vivax* durante los años 2013 y 2015 (ver anexo 4). Adicionalmente, no se observó cambios estadísticamente significativos (p-valor > 0.05) entre ambos años.

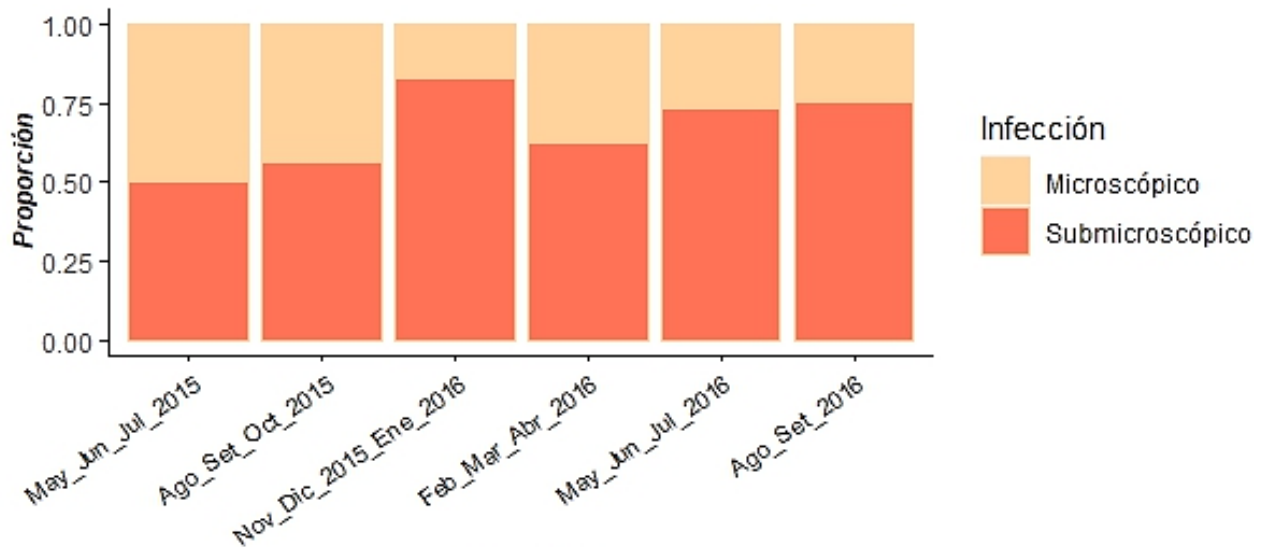


Figura 4: Proporción de infecciones submicroscópicas durante la vigilancia de casos 2015-2016. El color rojo representa la proporción (%) de las infecciones submicroscópicas y el color marrón claro representa la proporción de infecciones microscópicas. El eje x representa la agrupación trimestral desde el año 2015 hasta el 2016, y el eje y el porcentaje de las infecciones.

4.2 Genotipificación de las muestras de *P. vivax* durante el 2015 y 2016

Se detectaron 529 muestras positivas a *P. vivax*, de estas solo el 45.3% (n=240) fueron genotipificadas, las muestras restantes presentaron una parasitemia por debajo de 1.5 mol/ μ L. De las muestras que fueron genotipificadas, el 92% (n=221) de las muestras amplificaron más del 63% de loci, a este grupo se adicionaron 139 muestras genotipificadas el año 2013 y publicadas previamente (7). En resumen, los microsatélites MS6 y 11.162 fueron los que amplificaron en menor porcentaje, generando en promedio 8.2% de información alélica perdida (ver anexo 5). Por otro lado, la curva de acumulación de haplotipos mostró que al menos 10 loci o marcadores microsatélites son suficientes para poder discriminar cerca del 100% de todos los haplotipos de las muestras, tal como se observa en el anexo 6. En total se analizaron 360 muestras, de las cuales 139 correspondían al año 2013, 150 al año 2015 y 71 al año

2016. Se encontró un 42% de infecciones policlonales en el 2013, 46% en el 2015 y 29.6% en el 2016, la prueba de proporciones mostró que no existen cambios estadísticamente significativos (p -valor >0.05) de la proporción de policlonales a través del tiempo (ver anexo 7).

4.3 Métricas de diversidad genética durante la vigilancia de casos 2013 y 2015-2016.

Se encontró una moderada ($He=0.595 \pm 0.147$) a alta diversidad genética ($He= 0.636 \pm 0.187$) durante los 3 años de la vigilancia de casos, tal como se observa en la figura 5a. La prueba de Montecarlo mostró que no hubo cambios estadísticamente significativos (p -valor > 0.05) de la diversidad genética comparando el año 2013 con los años 2015-2016 (ver anexo 9). El número de alelos efectivos y el *ratio* mutacional poblacional (R.M Poblacional) no cambiaron de manera significativa (p -valor > 0.05) a través del tiempo, tal como se observa en el en la figura 5a y anexo 10.

En general, se encontró un desequilibrio de ligamiento (LD) bajo (I_A^s) <0.1 ya sea sin corrección clonal (LD sin cc) y con corrección clonal (LD cc); pero tuvo un mayor descenso durante el año 2015 y 2016, sin embargo, estos cambios no fueron significativos entre los años de muestreo (p -valor > 0.05) tal como se observa en la figura 5a y anexo 10. Por otro lado, el Índice de Simpson y la Multiplicidad de infección (MOI) no cambiaron de manera significativa a través del tiempo (p -valor > 0.05) tal como se observa en el grafico 5b y anexo 10. En el año 2016 se encontró una disminución de la proporción de infecciones policlonales; sin embargo, esto no produjo cambios estadísticamente significativos de estas proporciones comparado entre el 2013

y 2015-2016 tal como se observa en el anexo 7. Durante el año 2013 se encontró un déficit de heterocigotos (p-valor = 0.00061), lo que indica la ausencia de un reciente cuello de botella en la población de *P. vivax*. Lo mismo ocurrió durante los años 2015-2016 (p-valor = 0.00006) tal como se observa en el anexo 11. Por último, los valores de cada métrica de diversidad genética obtenida se observan en el anexo 8.

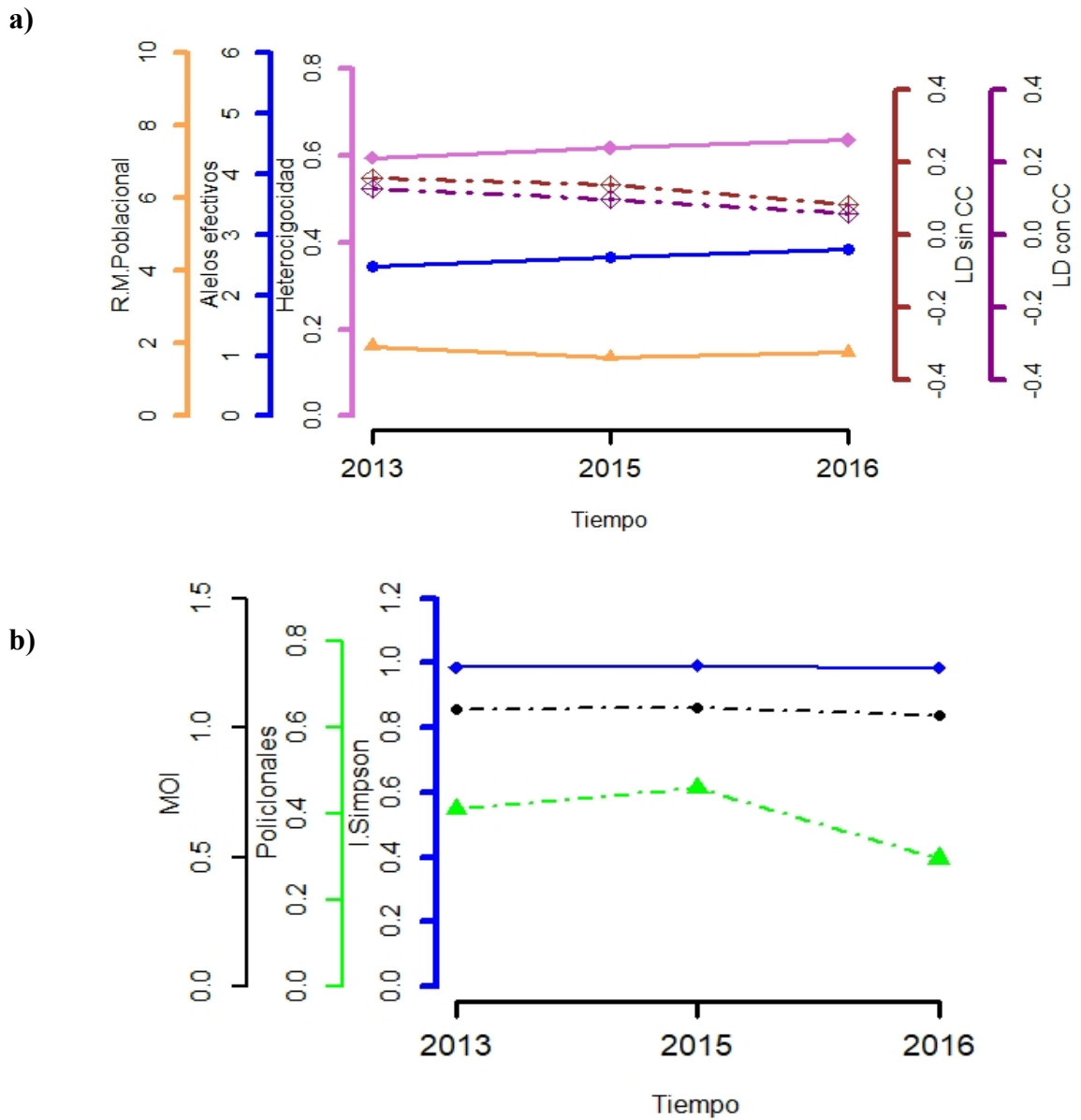


Figura 5: Métricas de diversidad genética a través del tiempo

En la figura a, en el lado izquierdo la línea de color lila representa la Heterocigocidad esperada (H_e), la línea de color azul, el número de alelos efectivos, la línea de color marrón, l tasa (ratio) mutacional poblacional. En el lado derecho la línea punteada de color marrón representa el desequilibrio de ligamiento sin corrección clonal (todos los haplotipos), la línea continua de color lila el desequilibrio de ligamiento con corrección clonal (haplotipos únicos). En la figura b la línea de color azul representa el Índice de Simpson, las líneas verde y negra representan la proporción de infecciones policlonales y Multiplicidad de infección respectivamente.

4.4 Diferenciación poblacional entre muestras del 2013, 2015 y 2016

Durante el seguimiento de casos se encontró una diferenciación genética poblacional significativa ($F_{st\ Jost} > 0.50$) entre las muestras del año 2013 y 2015, del mismo modo entre el 2013 y 2016 sugiriendo flujo genético dentro de Santa Emilia, tal como se observa en la figura 6. Sin embargo, entre los años 2015 y 2016 tuvieron algo de diferenciación poblacional entre los parásitos ($F_{st\ Jost} = 0.009$), pero también indica que el flujo genético no está interrumpido. En ese sentido se pudiera inferir que los parásitos circulantes durante la vigilancia no fueron las mismas poblaciones debido al flujo genético. Por otro lado, el análisis molecular de la varianza (AMOVA), muestra que la mayor diversidad genética (87%) se explica dentro de cada año comparado entre los años de muestreos, tal como se observa en el anexo 12.

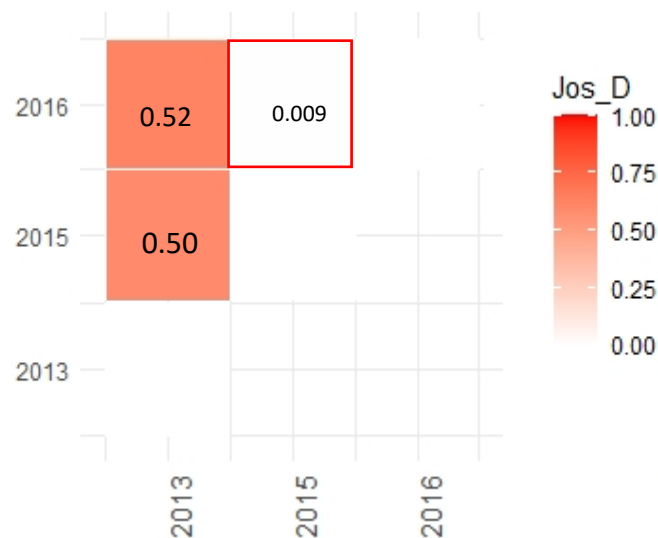


Figura 6: Diferenciación poblacional de las poblaciones de *P. vivax*.

Cada escala de calor representa el valor de la diferenciación poblacional entre años. Valores cercanos a uno representa mayor diferenciación poblacional e incremento de la escala del color rojo, mientras valores cercanos a 0 indican baja diferenciación poblacional y menor escala del color rojo.

4.5 Propagación clonal de las muestras de *P. vivax*

La red de expansión de haplotipos muestra que durante la vigilancia del año 2013 se encontraron 137 parásitos genéticamente relacionados, y del mismo modo 213 parásitos en el año 2015-2016. En este estudio dos haplotipos son considerados como relacionados (parásitos genéticamente relacionados) si ellos tienen una distancia genética de Bruvo menor a 0.3. Este resultado sugiere una propagación clonal de *P. vivax* durante el 2013, 2015 y 2016, siendo mayor entre estos dos últimos años, tal como se observa en la figura 7. No hubo diferencias estadísticamente significativas (p -valor >0.05) en la proporción de parásitos genéticamente relacionados entre el 2013 comparado al 2015-2016 (ver anexo 13).

Adicionalmente se encontró 2.7% (10) parásitos genéticamente no relacionados durante los tres años de vigilancia, sugiriendo que estos sean nuevos o parásitos importados hacia Santa Emilia.

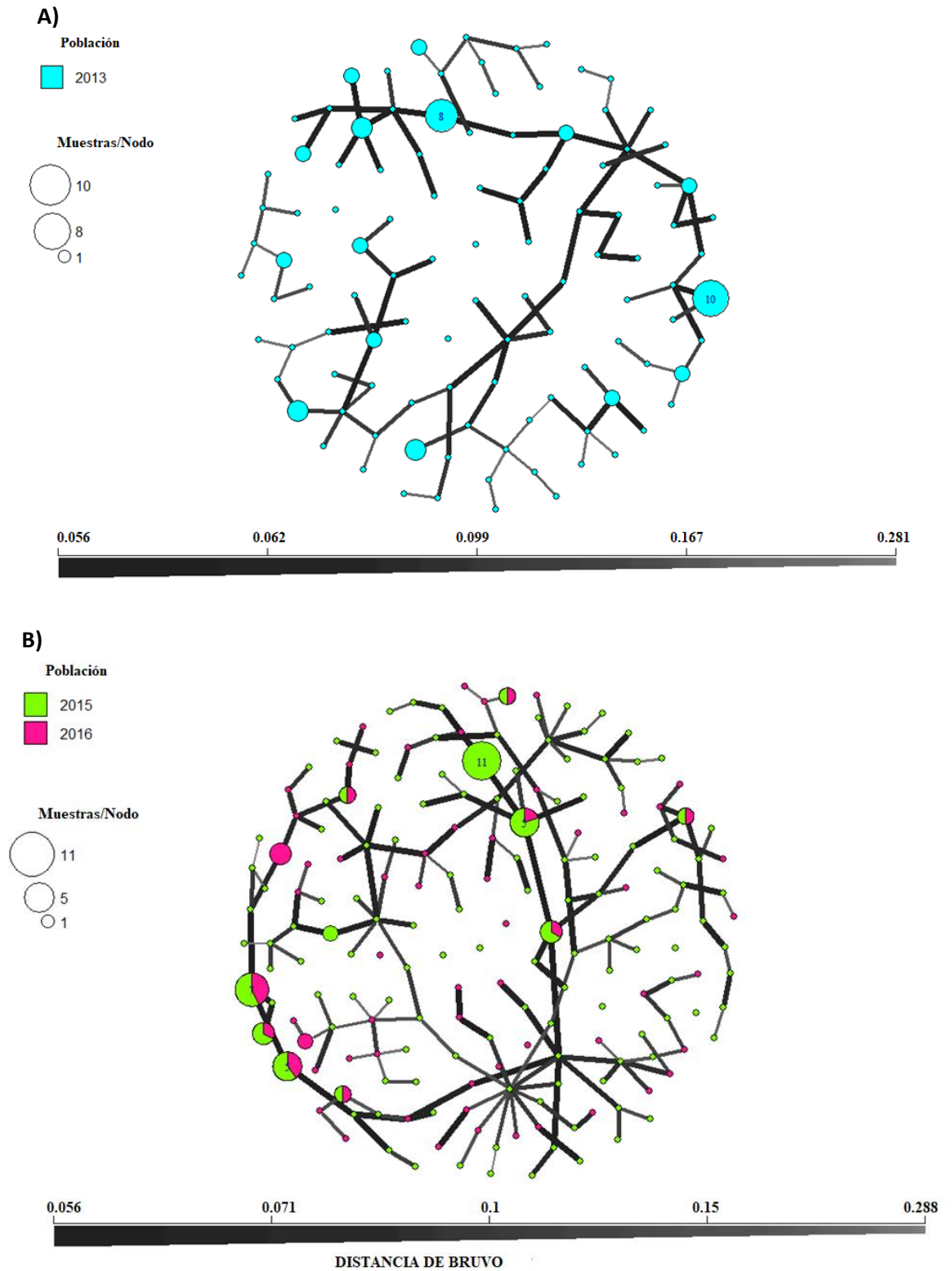


Figura 7: Red de expansión de haplotipos. (A) haplotipos encontrados en el año 2013, (B) haplotipos encontrados en el 2015 y 2016, cada círculo representa un haplotipo de una muestra, el tamaño del círculo representa el número de muestras de cada haplotipo y las líneas oscuras representan las distancias genéticas entre los haplotipos, mientras más gruesa la línea, menor distancia genética o más emparentados los haplotipos.

4.6 Estructuración poblacional de *P. vivax*

Durante la vigilancia de casos del año 2013 se observó estructuración poblacional, con cuatro ($\Delta K=4$) poblaciones más probables (ver anexo 14), y menor admixture comparado al año 2015-2016. Las poblaciones naranja y verde contribuyeron en promedio 66.6% y 30.1% respectivamente dentro de la estructuración poblacional del 2013 (ver anexo 28). Durante el 2015 y 2016 las poblaciones celeste y morado contribuyeron en promedio 49.1% y 39.8% respectivamente, y fueron creciendo a comparación de las poblaciones del año 2013 que disminuyeron significativamente (< 7.4%). Esto sugiere que las poblaciones del 2015 y 2016 se volvieron más dominantes o hubo una expansión dentro de la comunidad.

Por otro lado, se observó la presencia de parásitos híbridos que se han conservado del año 2013, como por ejemplo los marcados en color naranja y verde. Por último, se evidenció mayor número de poblaciones híbridas durante la vigilancia de casos entre los años 2015-2016 tal como se observa en la figura 8.

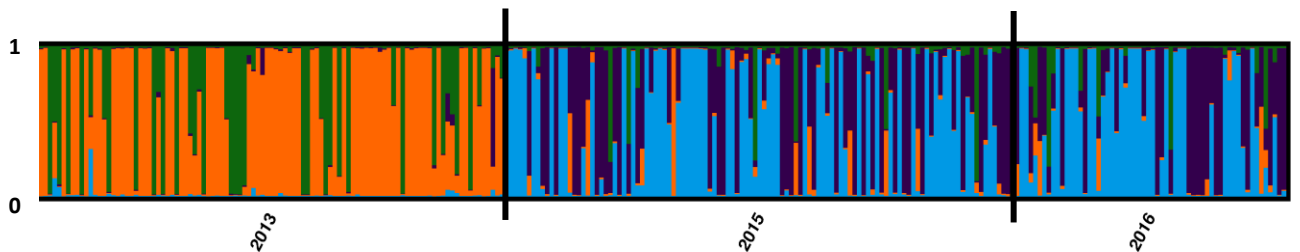


Figura 8: Estructuración poblacional de *P. vivax* entre los años 2013 y 2015-2016. Cada color representa una población del parásito, el valor del eje *x* representa los años de muestreo. Por otro lado, el valor del eje *y* indican la probabilidad de pertenencia de un muestra a cada población.

V. DISCUSIÓN

Este estudio revela una alta proporción de infecciones submicroscópicas de *P. vivax* en la comunidad de Santa Emilia durante el 2015-2016, con una alta diversidad genética ($H_{exp} = 0.63 \pm 0.18$), comparado con las infecciones del año 2013 ($H_{exp} = 0.59 \pm 0.14$) y una significativa diferenciación poblacional ($F_{st_{Jost}} > 0.5$) comparadas entre el 2013 y 2015-2016, sugiriendo algo de flujo genético dentro de Santa Emilia posiblemente promovidos por el movimiento poblacional.

Estos hallazgos permiten explicar el mantenimiento de la transmisión local y la estructuración poblacional que contribuyen con la micro-epidemiología de *P. vivax* en un escenario que se ve favorecido por las intervenciones intermitentes del MINSA convirtiendo a Santa Emilia en un área vulnerable al ingreso de parásitos. Estos resultados encontrados son congruentes con estudios previos realizados en pequeñas comunidades de países como Tailandia, China Central, Colombia, Brasil y Venezuela (62,106–109) donde la alta diversidad genética, la sustancial diferenciación poblacional (7,64,110) y una estructura población heterogénea mantienen la transmisión de este parásito, junto a la existencia de poblaciones genéticas estables.

La alta proporción de infecciones submicroscópicas encontradas en este estudio son debido a la baja parasitemia producida por *P. vivax*. Esto puede ser explicado por su preferencia de invadir reticulocitos jóvenes para desarrollar el estadio de esquizonte (111). Los reticulocitos jóvenes representan menos del 5% comparado con las poblaciones de eritrocitos maduros y viejos que circulan dentro del torrente

sanguíneo. Diferentes estudios han reportado una alta carga de infecciones submicroscópicas en áreas con variables escenarios epidemiológicos de transmisión (48,112,113). Sumado a esto, trabajos desarrollados en diferentes comunidades de la Amazonia Peruana mostraron la presencia del 80% de infecciones submicroscópicas (4,113), como por ejemplo las comunidades de Mazan y Lupuna (19,114). Estas comunidades se caracterizan por tener una transmisión residual y heterogénea, favorecidas por su conectividad a través del río y la carretera con otras comunidades, a comparación de Santa Emilia que se encuentra aislada geográficamente, pero que también presenta infecciones submicroscópicas que se convierten en los reservorios de esta infección contribuyendo con la transmisión local.

Las infecciones submicroscópicas son un reto para las estrategias de control clásicas aplicadas por el MINSA, como por ejemplo la detección pasiva de casos y el uso de la microscopia como técnica estándar de diagnóstico, ya que esta herramienta carece de la capacidad para detectar infecciones submicroscópicas. En ese sentido, es necesario implementar herramientas moleculares con mayor sensibilidad como por ejemplo la Amplificación Isotérmica Mediada por Horquilla (LAMP por sus siglas en inglés). LAMP ha sido sugerida como una herramienta fácil de implementar en zonas rurales y remotas donde existe una alta prevalencia de infecciones submicroscópicas asintomáticas (115,116). Por lo tanto, detectando estas infecciones submicroscópicas se podrían tratar oportunamente y cortar la transmisión.

Por otro lado, a pesar de la ubicación remota de Santa Emilia nuestra data sugiere que es una zona altamente receptiva y vulnerable al ingreso de nuevos parásitos, posiblemente por la continua movilización humana que existe en esta zona y que pueden permitir la importación de nuevos parásitos. Esta afirmación puede mantenerse por el flujo genético que mostró Santa Emilia evidenciado en su significativa diferenciación poblacional entre los años de este estudio, adicional a esto, previos estudios (7) reportaron conectividad con zonas distantes de transmisión de malaria como Lupuna y Cahuide. También es posible la conectividad de Santa Emilia con comunidades cercanas a esta como por ejemplo Víctor Raúl, 28 de Julio y El Cerro, que pueden mantener un flujo de parásitos y la transmisión entre ellos; pero se necesitan más estudios para poder demostrar esta hipótesis.

La presencia de viajeros, quienes pueden introducir nuevos parásitos y expandirse en las comunidades fueron evidenciados en varios estudios epidemiológicos y genéticos (29,117–119). En este estudio se han encontrado parásitos genéticamente no relacionados durante el 2013 y 2015-2016 sugiriendo que fueron importados de otro lugar, esto se corrobora en el flujo genético encontrado dentro de Santa Emilia. En esta comunidad los viajes son comunes, algunos pobladores de Santa Emilia, quienes se dedican a extraer madera, viajan varios días fuera de su comunidad, otros se dedican a la agricultura y, en ambos casos, sus productos son llevados a la ciudad de Nauta para ser vendidos. La ciudad de Nauta está conectada con Iquitos (capital de Loreto) a través de la única carretera en esta región. Estas personas podrían estar

contribuyendo con la movilización de parásitos entre comunidades; pero se necesitan estudios con este grupo poblacional para poder confirmar esta hipótesis. Por lo tanto, los viajeros podrían constituir otro factor de riesgo para mantener la transmisión de malaria, por lo que deberían ser considerados como un grupo prioritario dentro de las actividades de vigilancia y control por parte del MINSA.

La presencia de una alta proporción de infecciones policlonales (>40%) en el 2013 y 2015 son comparables con otros estudios reportados en la Amazonia Peruana (7,64). Sin embargo, estas proporciones son contrastantes con países como China, Malasia y Vietnam (62,110,120). Estas infecciones policlonales pueden ser explicadas por la dinámica del relapso causado por el hipnozoito de *P. vivax*, que no fueron evaluados en este estudio. El decrecimiento en la proporción de infecciones policlonales durante el 2016 puede ser atribuido al tamaño de muestra (n=71) utilizado en este estudio, esto debido al alto número de infecciones con densidades menores a 1.5 moléculas/ μ L que no fueron incluidos en los análisis lo que pudo haber generado un sesgo. Por otro lado, también se encontró un bajo MOI (1.07 – 1.04) comparable a un estudio conducido en otra área rural de la Amazonia Peruana (64), pero muy por debajo comparado con otros países (62,120). Este resultado proporciona una idea de la baja complejidad de las infecciones y posiblemente la ausencia de super-infecciones en Santa Emilia durante el 2013 y 2015-2016.

La ausencia de un reciente cuello de botella en la población, los cambios no significativos estadísticamente en la prevalencia de malaria, la alta diversidad

genética y el mantenimiento de poblaciones de parásitos encontrados en este estudio evidencian la persistencia de *P. vivax* a pesar de las intervenciones intermitentes realizadas en Santa Emilia, como las fumigaciones con insecticida dentro de los hogares (marzo 2012, marzo 2013 y octubre 2014) (121). La persistencia de este parásito ya ha sido observado en Lupuna y Cahuide que tuvieron contrastantes escenarios micro-epidemiológicos (6). Estos resultados evidencian lo difícil que sería la eliminación *P. vivax* si no se establece un plan integrado, continuo y a largo plazo por parte de los programas de control y eliminación.

Temporalmente, Santa Emilia mostró un patrón dinámico de la estructuración poblacional. Este patrón fue reportado previamente en esta misma comunidad así como también en Lupuna, Cahuide y comunidades asentadas en la carretera Iquitos- Nauta (7,64). La contribución inicial de dos poblaciones durante el 2013 y su significativa disminución durante el 2015-2016 evidencia su desplazamiento por otras poblaciones, posiblemente favorecidas por el contexto de la transmisión local como por ejemplo la importación de parásitos o las intervenciones intermitentes en Santa Emilia. El aumento del admixture (apareamiento de dos clones genéticamente diferentes) en el 2015-2016 también fue notorio en Santa Emilia, esto implica la recombinación con parásitos del año 2013, este dinamismo es una evidencia de la rápida adaptación del parásito a la transmisión local y la receptividad de la malaria a esta zona. También se encontró un menor número de individuos híbridos y después se observó un incremento de estos, el incremento de

infecciones híbridas puede deberse a la recombinación de parásitos que estaban circulando en el 2013 y se combinaron con nuevos parásitos, posiblemente importados del año 2015 que ingresaron y se lograron transmitir (expansión clonal) y permanecer dentro de la comunidad durante el año 2016.

Se espera la reducción de la población del parásito, junto a una baja diversidad genética en respuesta a las intervenciones hechas por el MINSA (55). Sin embargo, se ha visto que *P. vivax* muestra un patrón opuesto debido a la alta diversidad genética y estructura poblacional después de intervenciones, y una baja intensidad de transmisión como reportan varias publicaciones (63,108,119). En este estudio también se ha observado la ausencia de cambios de la diversidad genética y el mantenimiento de las poblaciones bajo las intervenciones intermitentes, nuevamente confirmando la difícil eliminación de *P. vivax* a nivel local, si no se focalizan las intervenciones en base a las características micro-epidemiológicas de las comunidades endémicas.

El Plan Malaria Cero (2017-2021) produjo una disminución del 75% de casos de malaria en el 2020 y actualmente el Perú se encuentra ejecutando el Plan Nacional de eliminación de malaria centrando sus actividades en áreas remotas donde se concentra el mayor número de casos de malaria (122). El actual plan de eliminación debería incluir intervenciones continuas e integrales, que se focalicen en identificar y tratar las infecciones submicroscópicas con herramientas más sensibles y enfocadas en poblaciones móviles que actúan como medio de transporte de los parásitos.

Una limitación de este estudio es la baja sensibilidad del método de genotipificación debido al alto número de infecciones submicroscópicas que no fueron incluidas en el análisis, y que produjo un sesgo en los análisis. Sin embargo, genotipificar el 45% de todas las muestras ofreció una buena cobertura de la población parasitaria y también el número de muestras fue suficiente para sobrepasar el mínimo requerido (30 muestras) para realizar el test de cuello de botella poblacional .

VI. CONCLUSIONES

- Santa Emilia presentó una prevalencia tres veces mayor de infecciones detectadas mediante PCR en tiempo real en comparación con la microscopía, además de una alta prevalencia (44%) de infecciones submicroscópicas. Estos resultados sugieren que las infecciones submicroscópicas son comunes en áreas remotas y aisladas geográficamente.
- Los datos indican que Santa Emilia mantuvo una alta diversidad genética durante los tres años de estudio, con la presencia de cuatro subpoblaciones clonales con niveles similares de endogamia. Esto evidencia una transmisión continua a nivel microgeográfico, destacando la necesidad de que las estrategias de control consideren este aspecto de la transmisión local de la malaria.
- Tanto antes como durante la vigilancia de casos, no se observó un reciente cuello de botella poblacional, pero sí un aumento en la proporción de parásitos genéticamente relacionados, lo que sugiere una expansión clonal de la población de *P. vivax*. Esta expansión estuvo acompañada por la entrada de nuevos parásitos de múltiples fuentes, facilitada por la movilización humana, un factor clave a considerar en futuras investigaciones.

CAPÍTULO 2

DESCRIPCIÓN DE LA MOVILIZACIÓN HUMANA, SU IMPORTANCIA EN LA TRANSMISIÓN DE LA MALARIA Y DIVERSIDAD GENÓMICA DE *P. vivax* EN LAS COMUNIDADES DE LIBERTAD Y URCOMIRAÑO.

I. INTRODUCCIÓN

La malaria causada por *Plasmodium vivax* representa una carga significativa para la salud global. Se estima que cada año se producen cerca de 14.3 millones de casos de *P. vivax* (123), y cerca del 80% de un aproximado de 900 mil infecciones son reportadas anualmente en las Américas (1). En Perú hasta diciembre del 2023 se han reportado más de 18 mil casos por este mismo parásito, esto representa el 84.37% de todos los casos reportados en el país, y el mayor número de estas infecciones se concentran en la Amazonia Peruana con 16880 casos notificados (85). En consecuencia, *P. vivax* aún continúa afectando la salud de las poblaciones sobre todo en la Amazonía Peruana.

Los programas de control y eliminación de la malaria implementados en la Amazonia Peruana han tenido un impacto significativo, pero no continuo. Por ejemplo, hasta la culminación del Proyecto Control de Malaria en las Zonas Fronterizas de la Región Andina (PAMAFRO) (2005-2011) se llegó a disminuir la malaria hasta 11 mil casos (82); sin embargo, por falta de financiamiento externo y la falta de continuidad por parte del MINSA, los casos aumentaron hasta 65,000 en el año 2014 (3). Posteriormente, el gobierno peruano asumió el reto de controlar la malaria

implementando el Plan Malaria Cero (PMC) (2017 hasta el 2022) enfocado principalmente en Loreto, reportándose una disminución de casi el 75% de casos en esta región (124). En el 2022, el MINSA publicó el Plan Nacional de Eliminación, el cual incluye a todos los distritos que han reportado casos de malaria entre los años 2011-2020 (84), el objetivo de este plan es disminuir los casos de malaria en 90% para el año 2030.

En ese nuevo escenario, con las intervenciones continuas realizadas por el PMC que han permitido disminuir los casos microscópicos, algunas comunidades del distrito de Mazán, como por ejemplo en Libertad y Urcomiraño aún se mantiene la transmisión residual. La malaria residual son todas las formas de transmisión de malaria que persisten pese a la alta cobertura de las intervenciones y/o estrategias generadas e implementadas en diferentes áreas geográficas (125).

Asimismo, Libertad y Urcomiraño mantienen una alta y baja movilización humana respectivamente (30,32). Debido a estas características, ambas comunidades son ideales para realizar estudios de movilización poblacional para establecer su posible rol en mantener la transmisión y también para evaluar los cambios poblacionales espaciotemporal de *P. vivax* usando datos epidemiológicos y genómicos.

Estudios previos a nivel micro-epidemiológico en las comunidades de Libertad y Urcomiraño señalan que las infecciones causadas por *P. vivax* fueron submicroscópicas con una prevalencia del 20% por PCR en tiempo real y un 87.6% no presentaron síntomas (4). Este tipo de infecciones no detectadas por el método de diagnóstico utilizados por el MINSA, podrían estar implicados en la malaria residual. Un estudio

con enfoque genético poblacional con 16 microsatélites en las mismas comunidades, encontraron infecciones importadas de *P. vivax* (126).

Las infecciones importadas son aquellas detectadas dentro de una comunidad, pero son distintas a su origen (39). En el mismo estudio genético poblacional también encontraron que los individuos con infecciones importadas estaban asociados con viajes en el último mes, infiriéndose que el movimiento poblacional puede ser un factor de riesgo para el transporte del parásito a un lugar diferente de su origen y de esta manera también puede contribuir con la persistencia de casos (126).

Estudios de genómica poblacional integrado con historial de viaje evidenciaron la importación de *P. vivax* hacia Panamá (79), lo mismo se observó entre las fronteras de Birmania y China (77), además de encontrarse que las poblaciones fueron clonales. Esto evidenció la vulnerabilidad de estas zonas para la continuidad de la malaria. Por tanto, las infecciones importadas pueden ser rastreadas integrando datos de historia de viaje y data genómica.

En base a estos antecedentes los estudios de genómica poblacional se convierten en herramientas prometedoras, para realizar estudios más finos a menor escala temporal y espacial y sumado a esto, el perfeccionamiento de las plataformas de secuenciamiento de segunda y tercera generación que están permitiendo generar más datos genómicos con mejor calidad para ser analizados. En este contexto, en este estudio se pretende establecer el rol de los viajeros en la movilización de parásitos que estarían manteniendo la transmisión residual de malaria, para esto se estudió de manera complementaria los cambios genómico-poblacionales de *P. vivax*.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

- Establecer el rol de los viajeros en la movilización de parásitos y caracterizar molecularmente las infecciones de *Plasmodium* spp. que contribuyen a mantener la transmisión de la malaria y las características micro-epidemiológicas de dos comunidades que se encuentran en vías de eliminación.

Objetivos específicos

- Describir los aspectos sociodemográficos de la población de Libertad y Urcomiraño.
- Identificar las infecciones de *Plasmodium* spp. en viajeros y definir la movilización humana como factor de riesgo asociado a mantener la transmisión de malaria en las comunidades de Libertad y Urcomiraño durante los años 2021 y 2022.
- Evaluar la diversidad genómica poblacional, diferenciación poblacional y las relaciones genéticas de *P. vivax* en muestras colectadas en Libertad y Urcomiraño durante el 2021 y 2022 y compararlos con datos de parásitos colectados entre el 2006 y el 2015 en diferentes comunidades de Loreto.

III. METODOLOGÍA

Se colectaron muestras de sangre capilar durante los años 2021 y 2022 en las comunidades de Libertad y Urcomiraño, comunidades ubicadas en el distrito de Mazán.

Este estudio se utilizaron muestras que fueron colectadas dentro de un proyecto aprobado por el comité de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia: “Dinámica de Transmisión de la Malaria Residual y Re-emergente en la Amazonía: Definiendo las Rutas Hacia la Eliminación de la Malaria (código SIDISI: 101518). Todos los procedimientos realizados siguieron los lineamientos establecidos en la Declaración de Helsinki. Previamente a la toma de muestra, se realizó la firma del consentimiento informado de los participantes. Adicionalmente se obtuvo la aprobación del protocolo específico de esta tesis en la categoría de Exenta (código SIDISI 207483).

3.1 Área de estudio y población

El estudio se llevó a cabo en 2 comunidades. La primera comunidad fue Libertad (3.496° S, 73.234° O), que se encuentra asentada al margen izquierdo del río Mazan. La segunda comunidad fue Urcomiraño (3.361° S, 73.064° O) que se encuentra ubicada al margen izquierdo del río Napo, tal como se observa en la figura 1.

La única forma de acceso a ambas comunidades es por vía fluvial. Libertad y Urcomiraño no cuentan con electricidad ni agua potable, sus principales actividades

económicas son la agricultura, pesca y el comercio. Asimismo, cada comunidad cuenta con un puesto de salud para la atención de la población.

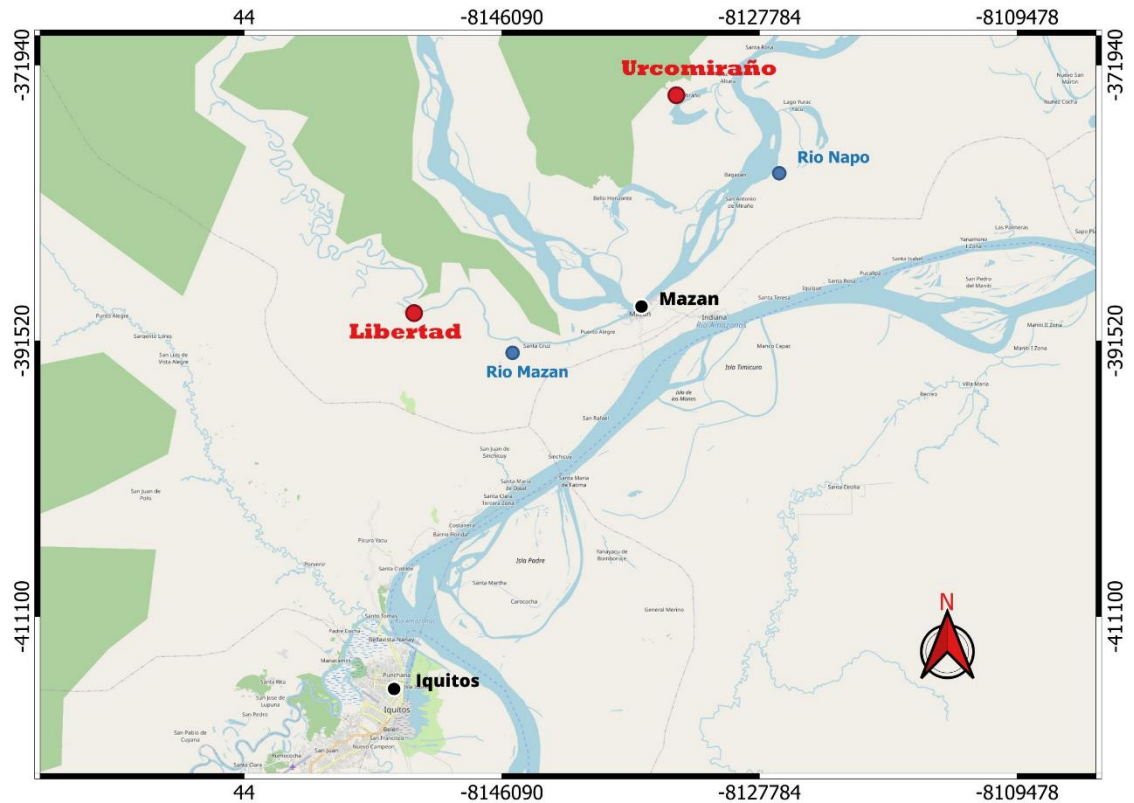


Figura 1: Mapa de la ubicación geográfica de las comunidades de Libertad y Urcomiraño ubicados en la cuenca del Mazán y Napo

En este estudio se colectaron datos y muestras de sangre capilar. En total los datos colectados provenían de 115 viviendas con 678 individuos. En Libertad estos datos estuvieron distribuidos en 56 casas con una población de 358 individuos, en Urcomiraño estuvieron distribuidos en 59 casas con 320 individuos.

Por otro lado, se logró captar un total de 144 individuos viajeros entre ambas comunidades del estudio. Un individuo viajero se definió como aquel que haya pasado por lo menos una noche fuera de su comunidad durante el último mes y un individuo sintomático es aquel que presentó al menos fiebre, dolor de cabeza o escalofrío.

Con el objetivo de realizar el secuenciamiento del genoma completo y el análisis de la diversidad genómica de *P. vivax*, se seleccionaron 36 muestras de los 678 individuos colectados entre ambas comunidades, sin embargo, solo 23 pasaron el filtro de calidad. Adicionalmente, se incluyeron 42 genomas de *P. vivax* previamente secuenciados y publicados en diferentes estudios (127,128), esto con el objetivo de evaluar los cambios de las poblaciones parasitarias a nivel espacio-tiempo durante la implementación de diferentes programas de control y eliminación de la Malaria.

Las 42 muestras incluidas, junto a las 23 secuenciadas en este estudio fueron categorizadas en base al tiempo de colecta, por lugar de muestreo (comunidad) y programa de control y eliminación de Malaria. Por ejemplo, las muestras colectadas durante los años 2006 a 2011, fueron denominadas como población parasitaria colectada durante el programa PAMAFRO, porque en ese periodo de tiempo se implementó este programa en todo Loreto. Las muestras colectadas durante los años 2012-2017, se consideraron como población parasitaria colectada antes del Plan Malaria Cero (PMC), y las muestras colectadas durante los años 2018-2022 se denominaron como población de parásitos durante el Plan Malaria Cero (durante PMC), programa que se ejecutó en Loreto.

Las 42 muestras de los otros estudios provienen de diferentes zonas geográficas. Por ejemplo: Padre Cocha (n=13), Puerto América (n=3), San Juan (n=14), Santa Clara (n=4) y Santo Tomás (n=8).

3.2 Criterios de exclusión e inclusión de muestras biológicas

Criterios de exclusión:

- Muestras positivas de personas menores de 3 meses de edad.
- Muestras negativas luego del re-diagnóstico molecular.
- Muestras mixtas para el análisis de diversidad genómica.
- Muestras negativas a *Plasmodium spp.*

Criterios de inclusión:

- Muestras positivas a *Plasmodium spp.*
- Muestras Positivas a *P. vivax* con Ct < 20 para los análisis de diversidad genómica

3.3 Diseño de Estudio

Este es un estudio prospectivo, longitudinal y descriptivo. Las muestras y los datos de los participantes fueron colectados mediante barridos mensuales desde febrero del año 2021 hasta julio del 2022 en Libertad y Urcomiraño (ver figura 2), la información sociodemográfica fue recolectada a través de encuestas epidemiológicas. En este sentido cada participante pudo brindar entre 1 a 12 muestras o registros.

De manera paralela se realizó la vigilancia activa de casos de manera semanal, esto con el objetivo de buscar en cada hogar, individuos con o sin síntomas de malaria que realizaron viajes en el último mes. En la vigilancia activa, se aplicó encuestas de movilización y sintomatología. Por último, se utilizó la detección pasiva de casos en los centros de salud de cada comunidad para incluir a los sintomáticos que pudieron no ser encontrados en sus hogares por la brigada de campo.

Las muestras de sangre capilar colectadas se colocaron en láminas porta objeto para realizar el diagnóstico microscópico, que se realizó de manera rutinaria en cada comunidad, y de manera paralela se tomó la temperatura y se preguntó por la presencia de síntomas. Los pacientes positivos a malaria por microscopia recibieron tratamiento antimalárico suministrado por el centro de salud y según la norma técnica de manejo de casos de malaria (91). Paralelamente la sangre capilar era colectada en tubos microtainer con EDTA y conservada a -20 °C hasta su procesamiento en el laboratorio. Este tipo de muestra fue utilizada para el diagnóstico molecular y el secuenciamiento del genoma completo.

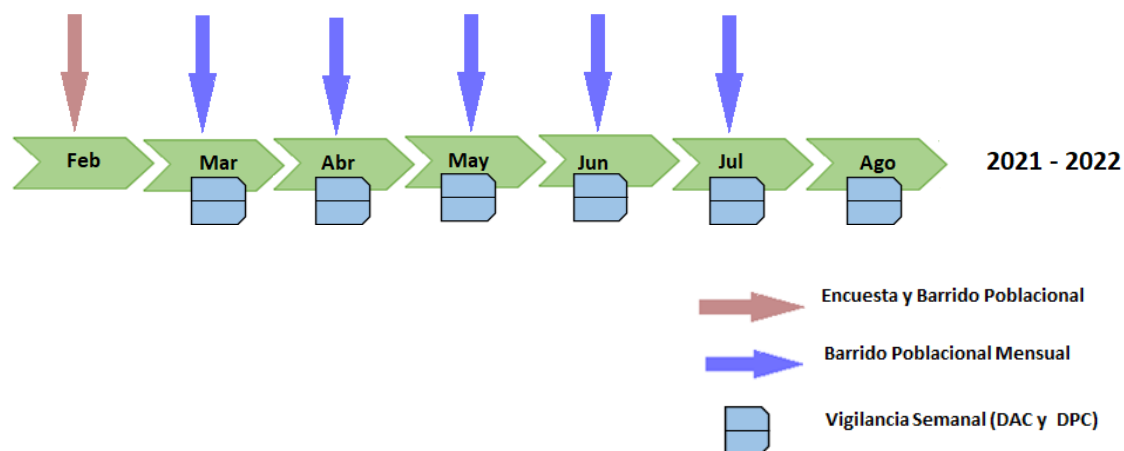


Figura 2: Diseño de estudio para la colecta de datos y muestras colectadas durante 2021 y 2022 en comunidades de Mazán (Libertad y Urcomiraño)

3.4 Diagnóstico microscópico y molecular de malaria

El diagnóstico microscópico se realizó utilizando el protocolo propuesto por el MINSA (92), que consistió en fijar con metanol puro y teñir las láminas con el reactivo de Giemsa. El diagnóstico fue realizado en ambas comunidades de manera mensual y durante la vigilancia activa y pasiva de casos de manera diaria.

El diagnóstico molecular se realizó de manera retrospectiva en el Laboratorio de Malaria: Parásitos y Vectores de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Se extrajo ADN a partir del 40µL de paquete globular, se usó el kit Omega y el ADN fue eluido en 50µL. Se utilizó la PCR en tiempo real y el protocolo propuesto por Rougemont y colaboradores (129), para el diagnóstico y la diferenciación de la especie de *Plasmodium* spp. se hizo mediante el uso de sondas diseñadas para *P. vivax* y *P.*

falciparum. Se usó el kit de TaqMan™ Environmental Master Mix 2.0. La parasitemia se determinó en base a una curva estándar, con cinco diluciones seriadas: 2000 p/μL, 200 p/μL, 20 p/μL, 2p/μL. El límite de detección del protocolo fue 2 parásitos/μL. Adicional a esto se usó una muestra de *P. falciparum* proveniente de un cultivo como control positivo y una muestra de un paciente sin malaria como control negativo para la extracción de ADN. Los controles para la PCR en tiempo real consistieron en muestras de pacientes con alta parasitemia de *P. vivax* y *P. falciparum*. Se seleccionaron muestras positivas a *P. vivax* para realizar el secuenciamiento del genoma completo.

3.5 Secuenciamiento del genoma completo de *P. vivax*

Se seleccionaron 36 muestras para el secuenciamiento, estas muestras fueron categorizadas en tres grupos. El primer grupo consistió en escoger muestras con parasitemias mayor a 1000 parásitos/μL, el segundo grupo consistió en muestras de individuos que habían reportado viaje en el último mes, pero casi el 90% de estas muestras tenía parasitemia por debajo de 50 parásitos/μL. Por último, el tercer grupo eran muestras con parasitemias mayor a 5000 parásitos/μL y todos sintomáticos, en este grupo se tuvo que incluir muestras con alta parasitemia colectadas en los años 2015 y 2017 en las mismas comunidades debido a que las muestras restantes colectadas en este estudio tenían baja parasitemia.

A las muestras del grupo uno se les hizo una ronda de Amplificación Genómica Selectiva (AGS) para incrementar la densidad del ADN, para esto se utilizó el protocolo propuesto por Cowell (94), al segundo y tercer grupo se realizó dos rondas de

amplificación genómica selectiva. Para la AGS se utilizó el kit de amplificación genómica “ilustra GenomiPhi V2 DNA amplification (Cityva). La primera ronda de la AGS consistió en la mezcla de un set de 10 cebadores pvSET1 50 μ M (5-CGTTG*C*G-3, 5-TTTTTTC*G*C-3, 5-TCGTG*C*G-3, 5-CGTTTTTT*T*T-3, 5-TTTTTTC*G*T-3, 5-CCGTT*C*G-3, 5-CGTTTC*G*T-3, 5-CGTTTC*G*C-3, 5-CGTTTT*C*G-3, and 5-TCGTTTC*G*T-3). Los asteriscos de estos cebadores representan un enlace fosforotioato, para evitar su degradación por la actividad endonucleasa de la enzima phi29. La segunda ronda de la AGS consistió en mezclar otro segundo set de cebadores. Asimismo, se añadió dNTPs 10mM, ADN genómico de *P. vivax*, buffer 10X, y 5 Unidades/rx de la enzima polimerasa phi 29. El volumen final de la reacción fue de 50 μ L.

3.6 Limpieza de productos de amplificación genómica

Los productos de amplificación de la primera y segunda ronda del AGS, fueron limpiados utilizando perlas magnéticas de la marca Ampure XP, y el uso de una placa magnética. Este procedimiento se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3.7 Preparación de bibliotecas

Una vez concluida la limpieza de los productos de AGS, se procedió a cuantificar la concentración de ADN obtenido, mediante el kit QubitTM dsDNA siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Para la preparación de la biblioteca, primero se realizó la tagmentación, es decir cortar el ADN con una enzima transposoma. La

tagmentación consistió en colocar el ADN diluido en un rango 0.2 a 10 ng/μL, y se colocó un volumen de reacción de 50μL en el termociclador a una temperatura de 55 °C por 5min y 10 °C por un tiempo indeterminado. Luego de esto, se colocó los indexes (i5 y i7), mediante una PCR convencional. El termociclador fue programado de la siguiente manera: 72 °C por 3 min, 12 ciclos con una temperatura 95 °C por 10seg, 95 °C por 30seg y 72 °C por 30 seg. y por 1 ciclo 72 °C por 5min en un volumen de reacción final de 50μL.

La limpieza de la biblioteca genómica se realizó mediante el uso del reactivo AmpureXP, y el uso de perlas magnéticas utilizando el protocolo recomendado por el fabricante. Posteriormente, se realizó la cuantificación de biblioteca, para esto se usó el kit Qubit™ dsDNA HS, y se siguió las recomendaciones del fabricante.

Luego se realizó la unión de todas las muestras en una sola mezcla (pool) con el uso del reactivo RSB. Se utilizó la siguiente fórmula para diluir el pool de ADN en una concentración de 2 ó 4nM.

$$\frac{ng/\mu L \times 10^6}{660 \frac{g}{mol} \times \text{Tamaño promedio de librería (bp)}} = \text{Molaridad (nM)}$$

Posteriormente, se hizo la denaturación de las hebras del ADN con NaOH a 0.2 N, luego se agregó la solución HT1. Si el pool estaba a una concentración de 2nM entonces la concentración final del pool de bibliotecas estaba a 10pM, pero si la concentración estaba a 4nM, el pool denaturado estaba a 20pM.

Terminada la denaturación del pool se agregó 2ul a 10nM del fago PhiX como control genómico positivo. Luego se cargó el pool de bibliotecas diluidas hasta 8pM en 600mL en la solución de HT1 en el recipiente del kit Miseq v2 de Illumina. Finalmente se colocó en el equipo secuenciador Miseq de Illumina, donde se llevó a cabo el secuenciamiento del genoma completo.

3.8 Análisis estadístico

Para la limpieza y manipulación de la base epidemiológica de los barridos mensuales y viajeros se usó el programa estadístico R versión 4.2.3 y R Studio. Se utilizó los paquetes *tidyverse*, *dplyr* y *sjmisc*. La descripción epidemiológica de los participantes y viajeros de ambas comunidades se realizó en R con los paquetes *stats*, *readxls*, *tidyverse*, *writexl* y *dplyr*, para la significancia estadística se usó un p-valor < 0.05 . Las pruebas exactas de Fisher y Chi-cuadrado fueron usados para comparar las proporciones de las variables entre comunidades. Las figuras descriptivas fueron preparadas en el paquete estadístico *ggplo2* implementadas en R. Para los índices de conectividad entre las comunidades de Libertad y Urcomiraño se utilizó los paquetes *igraph* y *ggraph* implementado en R y R Studio.

Para encontrar los factores de riesgos asociados a malaria se usó el paquete *logit* implementados en R, se usó el método de balanceo de datos a través de re-muestreos (130) para superar el inconveniente del poco número de casos de malaria.

Por otro lado, el análisis del genoma completo y diversidad genética se usó el sistema operativo Linux y el programa estadístico R y R Studio. Para la evaluación de la calidad

de las secuencias cortas de ADN (*reads*) generadas durante el secuenciamiento del genoma completo se usaron los programas FastQc y como medida de resumen FastQ screen. Luego, se procedió a la alineación de los *reads* con el genoma de referencia propio de Iquitos *Plasmodium vivax* Peruvian Amazon (PvPAM) (131), luego se alineó con el genoma de humano y otras especies de malaria. Los diversos genomas fueron descargados de PlasmoDB (<https://plasmodb.org/plasmo/app>) y NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Para el alineamiento se utilizó el programa Burrows-Wheeler Aligner (bwa) con su función mem (132). Posteriormente, se generó los estadísticos del mapeo con el programa Picardtools (133). Adicionalmente, se estimó la cobertura promedio con el programa Bedtools (134). El llamado de variantes se realizó con el programa GATK4 y para generar los archivos gvcfs, se usó el programa HaplotypeCaller (135,136). La información de genotipos de los archivos gvcfs de cada muestra se juntaron en un archivo de variantes (vcf) con la información de genotipos de todas las muestras. Se usó la herramienta GenotypeGVCFs.

A partir del archivo vcf de todas las muestras, se continuó con los pasos de filtrado de variantes. Se generó un nuevo archivo seleccionando solo la información de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs). Luego se realizó un filtrado más riguroso siguiendo los parámetros sugeridos en el manual de GATK4 (137). Los SNPs se filtraron manteniendo aquellos con un mínimo de calidad de profundidad de 2 ($QD < 2$), un mínimo de calidad de mapeo de 30 ($QUAL < 30$).

El archivo vcf con los SNPs que pasaron el primer filtro fueron reducidos, limitando a determinadas regiones del genoma del parásito. Se excluyeron las variantes ubicadas en el genoma mitocondrial y del apicoplasto. Asimismo, se limitó a las variantes ubicadas en la región “core” del genoma parasitario, excluyendo regiones subteloméricas, según lo recomendado por Otto y colaboradores (138).

El siguiente paso consistió en el filtrado de las variantes en base a parámetros de cada variante y de las muestras analizadas. Se usó el programa VCFtool (139) para seleccionar los SNPs bi-alélicos, asimismo se filtraron aquellas variantes con cobertura promedio menor a 2, y también las variantes con más de 25% de datos faltantes. Luego, se eliminaron las muestras con más de 25% de datos faltantes.

Los análisis de diversidad genómica consistieron en 03 niveles. El primero fue el año de colecta de la muestra, el segundo, la procedencia (comunidad) y por último la categorización en 03 subniveles del año de colecta en PAMAFRO (2006-2010), antes (2012-2017) y durante del Plan Malaria Cero (2018-2022).

Para el análisis de Heterocigocidad Esperada (H_e), es decir diversidad genética, se utilizó el paquete *diveRsity* y *adegenet*. Componentes principales (PCA).

La Diferenciación Poblacional fue medido mediante el F_{st} de Weir y Cockerham ($\theta = \frac{MSP - MSG}{MSP + (nc - 1) * MSG}$), donde el MSP es la varianza observada entre poblaciones, MSG la varianza genética dentro las poblaciones, nc es el tamaño efectivo de muestra, que corrige el sesgo introducido por el tamaño de muestra entre poblaciones, esto se realizó en el paquete *hierfstat*.

Para evaluar las relaciones genéticas entre los parásitos se realizó el árbol filogenético de NJ sin raíz (sin un ancestro en común reciente). La longitud de las ramas se evaluó mediante una matriz de distancias euclidianas, traducidas en distancias genéticas (menor distancia menor diferencia y divergencias genéticas, mayor distancia mayor diferencias genéticas, o historia evolutiva diferente) y un Bootstrap de 1000 remuestreos para evaluar la confiabilidad estadística del agrupamiento de las muestras dentro del árbol. Se utilizó el paquete estadístico, *poppr* y *ape* implementados en R. El árbol fue editado en el programa Mega V.2.

La identidad por Descendencia (IBD) se calculó para determinar la similitud genética o si existe clonalidad en la población, para esto se midió el número de SNPs compartidos/longitud del genoma (en SNPs). Adicional a esto el paquete *isoRelate* utiliza el modelo de Markov oculto para inferir haplotipos a partir de genotipos observados y también toma en cuenta la tasa de recombinación en cada segmento del genoma. Para generar los gráficos del IBD se usaron los paquetes, *RColorBrewer* y *ggplot2* implementados en R y R Studio.

IV. RESULTADOS

4.1 Casos de malaria en la comunidad de Libertad y Urcomiraño

Se detectaron 119 casos de malaria en las comunidades de Libertad y Urcomiraño. De estos casos el 78.2% (n=93) fueron causados por *P. vivax*, 16.8% (n=20) corresponden a las infecciones causadas por *P. falciparum*. Solo 5%(n=6) infecciones fueron mixtas (*P. vivax/P. falciparum*). El mayor número de casos fueron reportados en la comunidad de Libertad, tal como se observa en la tabla 1.

Tabla 1: Detección de casos de malaria en las comunidades de Libertad y Urcomiraño

Malaria	Libertad		Urcomiraño		Total
	2021	2022	2021	2022	
<i>P. vivax</i>	16	56	14	7	93
<i>P. falciparum</i>	18	2	0	0	20
Mixtos	2	4	0	0	6
Total	36	62	14	7	119

4.2 Descripción sociodemográfica de los participantes del estudio

Se colectaron datos sociodemográficos de 678 individuos, distribuidos en la comunidad de Libertad (n=358) y Urcomiraño (n=320). El 54.3% (n=368) fueron hombres y 45.7% (n=310) mujeres, no se encontraron diferencias significativas (p-valor > 0.05) entre la proporción de esta variable entre comunidades. El 59.9% (n=406) fueron mayores de 15 años de edad y 40.1% (n=272) fueron menores de 15 años, no se encontró diferencias significativas (p-valor > 0.05) entre la proporción de esta variable entre comunidades. El nivel de educación de los individuos mayores de 3 años fue distribuido en tres categorías. El 19.5% (n=132) no presentaron ningún nivel educativo, el 50.9% (n=345) tuvieron un nivel entre inicial y primaria, y 29.6% (n=201) entre el nivel secundaria y educación superior. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p-valor = 0.0004 – 95% IC [1.40 – 3.46]) en la proporción de individuos que no tuvieron ningún nivel educativo y el nivel secundario- superior, adicionalmente entre el nivel primaria, secundaria y superior (p-valor = 0.0004 – 95% IC [1.35 – 2.89]).

La ocupación fue categorizada en dos niveles de respuesta (si o no), si el individuo al menos es agricultor, maderero y pescador o no. El 58.1% (n=394) se dedica al menos a una de estas actividades y el 41.9% (n=284) realiza otras actividades, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p-valor > 0.05) entre estas proporciones entre comunidades. La siguiente variable escogida fue el tiempo de vida en la comunidad, para esto solo se analizaron individuos con una edad mayor a 10 años y que no siempre han vivido en la comunidad, en Libertad (n= 117) y Urcomiraño (n=41). De estos el 39.2% (n=62) viven menos de 2 años en ambas comunidades, el

27.8% (n=44) entre 2 a 9 años y el 32.9% (n=52) mayor a 10 años. La prueba exacta de Fisher mostró que existe diferencias significativas (p-valor = 0.001, 95% IC [1.67 – 13.2]) entre la proporción de individuos que vive menos de 2 años y mayor a 10 años entre ambas comunidades.

Por otro lado, se analizó el número de episodios de malaria que tuvieron los participantes hasta la fecha de la encuesta en ambas comunidades. El 24.2% (n=164) nunca tuvo malaria, el 17.8% (n=121) tuvo un episodio de malaria, el 29.4% (n=199) entre 2 a 3 episodios y el 28.6% (n=194) más de 4 episodios de malaria. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p-valor = 0.007, 95% IC [0.29 – 0.79]) entre los individuos que presentaron 1 vez malaria comparado con los que tuvieron más de 4 episodios de malaria.

También se analizó las variables de característica de vivienda, como el material de la pared y el techo de la vivienda, los cuales no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre comunidades (ver anexo 15).

4.3 Descripción sociodemográfica de los viajeros participantes del estudio.

El 21.2% (144/678) de los participantes reportaron haber viajado y haber pasado por lo menos una noche fuera de su comunidad (Tabla 2). De estos, 76 viajeros pertenecen a la comunidad de Libertad y 68 viajeros a la comunidad de Urcomiraño. Se encontró que 60.1% (n= 89) fueron hombres y 37.2% (n=55) fueron mujeres, no hubo diferencias significativas entre hombres y mujeres viajeros entre ambas comunidades (p-valor >0.05). El 73.6% (n=109) de los viajeros fueron mayores de 15 años de edad,

y el 23.6% (n=35) fueron menores a 15 años de edad. La prueba exacta de Fisher no mostró diferencias estadísticamente en la proporción de estas edades entre comunidades (p-valor > 0.05). Por otro lado, el 42.4% (n=61) de los viajeros son madereros, pescadores o agricultores, y el 57.6% (n=83) tienen otra ocupación, se encontró diferencias estadísticamente significativas (p-valor = 0.02, 95% IC[1.06 – 4.60]) en la proporción de individuos que realizan estas actividades comparadas a los que se dedican a otras actividades.

Por otro lado, el 79.2% (n=114) de los viajeros reportaron haber realizado al menos 1 viaje durante el último mes, entre ambas comunidades, comparado con el 20.8% (n=30) que realizaron entre 2 a 5 viajes por mes. No se encontró diferencias estadísticamente significativas (p-valor > 0.05) entre la proporción de frecuencia de viaje entre comunidades. Adicionalmente, el 38.1% (n=48) de los viajeros tuvieron más de 4 episodios de malaria durante toda su vida, el 28.6% (n=36) tuvieron entre 2 a 4 episodios, seguido del 27.8%(n=35) que reportaron un episodio de malaria y solo el 5.6% (n=7) nunca tuvieron malaria (ver anexo 13). De estos 144 viajeros, el 43.1% (n=62) viajaron menos de 2 horas, el 35.4% (n=51) viajaron entre 3 a 24 horas y por último el 21.5% (n=31) viajaron más de 24 horas (p-valor = 0.002, 95% IC [1.58 – 8.78]). Todos estos resultados se muestran en los datos suplementarios en el anexo 16.

Por último, el 21.0% (25/119) de todos los casos de malaria fueron registrados en los viajeros y el 89% (106/119) de las infecciones reportadas en Libertad y Urcomiraño fueron del tipo submicroscópico, tal como se observa en la tabla 2

Tabla 2: Proporción de viajeros, sus infecciones y los casos submicroscópicos en las comunidades de Libertad y Urcomiraño

Comunidad	Población = 678		Casos de malaria = 119	
	Viajeros	submicroscópicos	viajeros con malaria	
Libertad	76	85	21	
Urcomiraño	68	21	4	
Total	144	106	25	
Proporción (%)	21.24	89.08	21.01	

El motivo principal por el cual las personas deciden viajar fuera de la comunidad de Libertad y Urcomiraño durante los meses de Febrero a Julio, es por asuntos familiares seguido por trámites documentarios, y por último trabajo o comercio tal como se observan en la figura 3

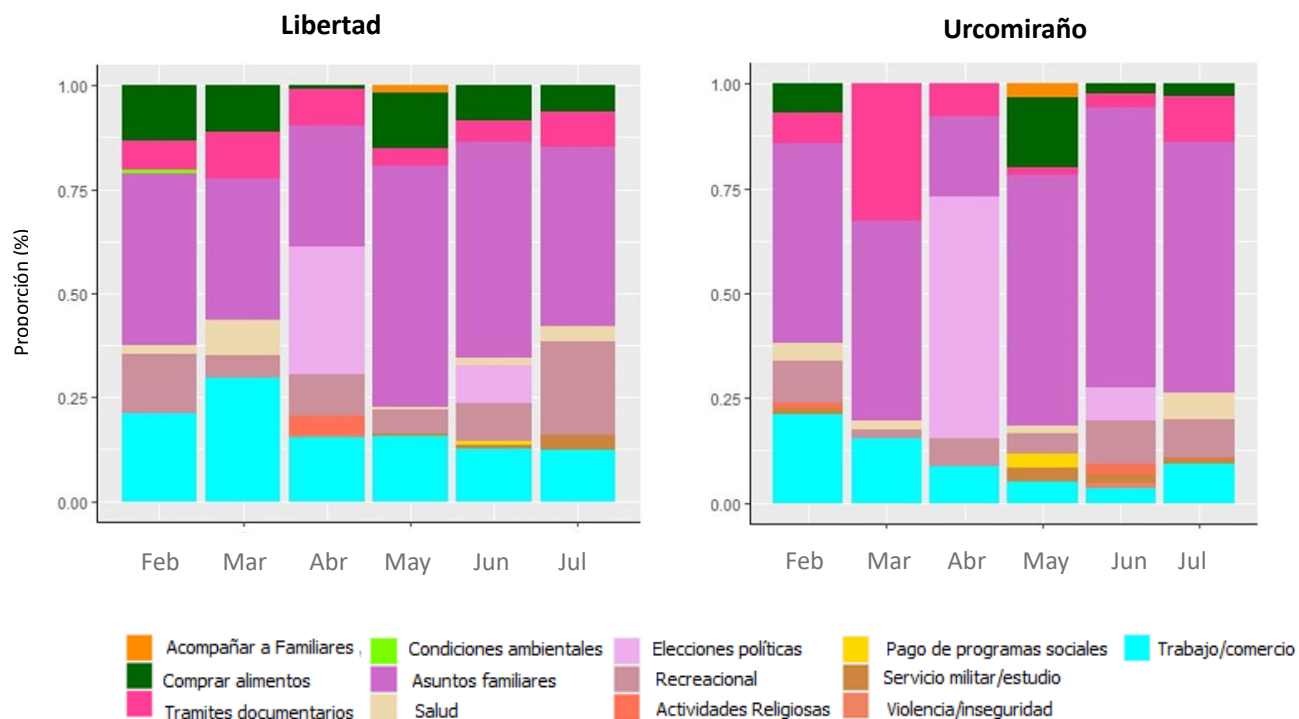


Figura 3: Proporción de los motivos de viaje en la comunidad de Libertad y Urcomiraño.
El eje Y representa la proporción (%) y cada barra de color representa el motivo de viaje. El eje X representa los meses donde se aplicaron la encuesta de viaje.

4.4 Patrones de movilización de los viajeros de la comunidad de Libertad y Urcomiraño.

El análisis de redes sociales de la movilización humana en la comunidad de Libertad y Urcomiraño sugieren una heterogeneidad en el desplazamiento en ambas comunidades (ver figura 4). Adicionalmente, el índice de conectividad out-degree = 80, sugiere que existe un mayor número de personas que viajan fuera de Libertad a comparación de Urcomiraño (out-degree = 41).

Sin embargo, existe más personas que visitan Urcomiraño (in-degree= 26) que Libertad (in-degree = 18). En su mayoría las personas de Libertad se desplazan a Mazan seguido a la ciudad de Iquitos, ese mismo patrón se observó en la comunidad de Urcomiraño.

Asimismo, los individuos de la comunidad de Libertad se desplazan hacia la quebrada Arahuana (out-degree = 12) donde realizan actividades como pesca o agricultura, y los individuos de Urcomiraño se desplazan hacia la quebrada Armas (out-degree =8) donde también realizan este tipo de actividades. Los índices de conectividad se encuentran en el anexo 17.

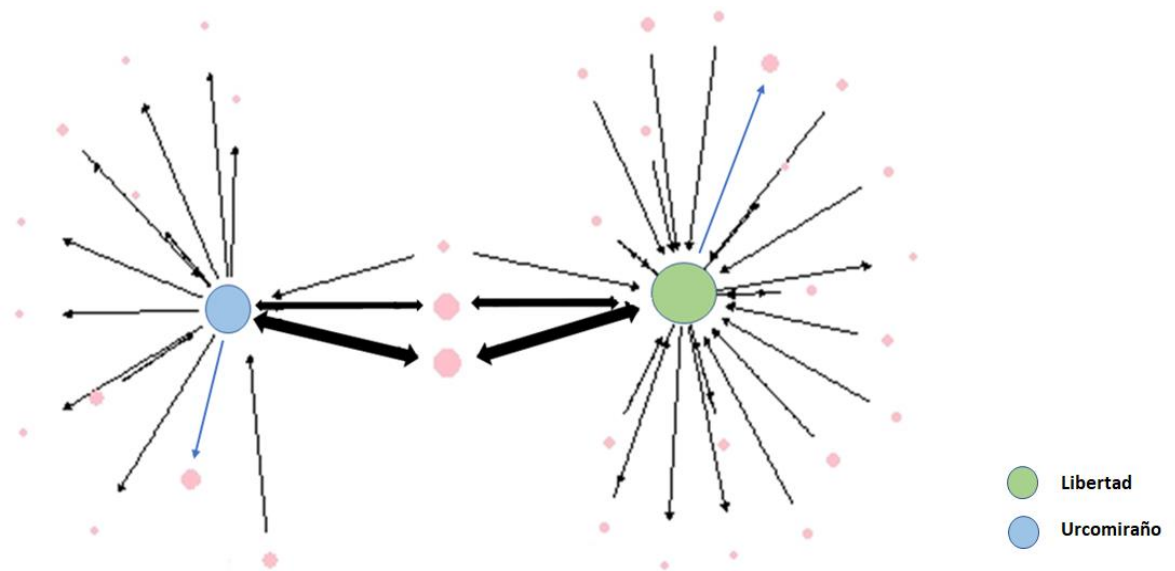


Figura 4: Análisis de redes sociales de los patrones de movilización en Libertad y Urcomiraño. Cada círculo representa una comunidad y las flechas y su grosor la dirección del movimiento y el mayor número de personas que participan del movimiento respectivamente. Las dos flechas celestes corresponden la salida a la quebrada Arahuana y Armas.

4.5 Factores de riesgo asociados a malaria

Se realizó un análisis multivariado para encontrar factores de riesgo asociados a malaria. Según la figura 5, los individuos que viajaron el último mes tienen 1.3 veces más riesgo de tener malaria comparado a los que no viajan. Del mismo modo los varones tienen 2.1 veces más de riesgo de tener malaria que las mujeres, y los que tienen edades mayor 15 años tienen 2 veces más riesgo que los menores de 15 años, todos estas variables mostraron ser estadísticamente significativas (p -valor <0.05).

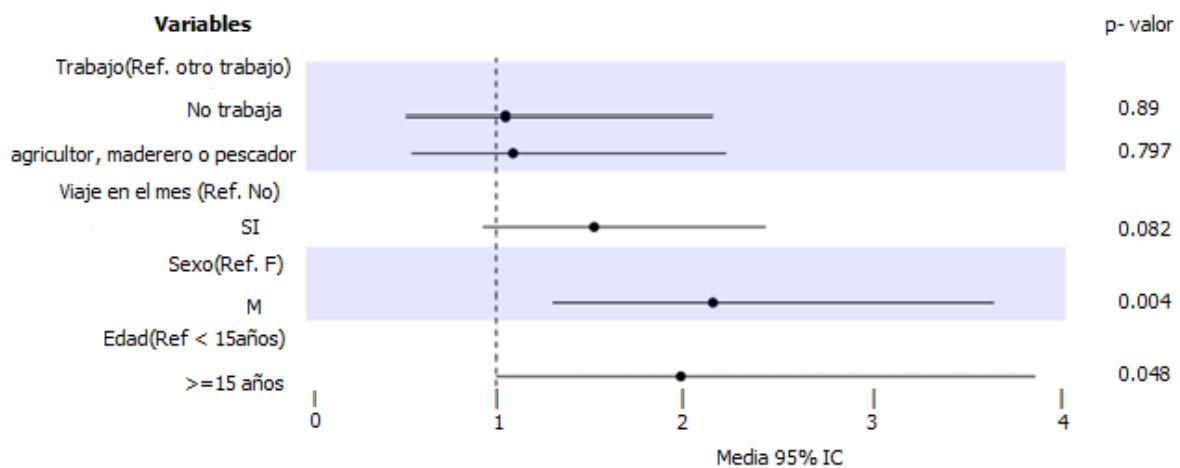


Figura 5: Factores de riesgo asociados a malaria.

El eje y (columna izquierda) representa las variables de estudio, el eje x el factor de riesgo, (IC) intervalo de confianza al 95%, y la columna del lado derecho el grado de significancia (p -valor) de cada variable de estudio.

4.6 Análisis de la diversidad genómica de los parásitos secuenciados en Libertad y Urcomiraño

Luego de realizar el alineamiento de las 36 muestras de los 03 grupos con genomas de Plasmodium y humano, el grupo 1 y 3 alinearon en su mayoría con Plasmodium a diferencia del grupo 2 que alineó en su mayoría con el genoma humano (anexos del 18 al 20), y se tuvo una cobertura media de 2 *reads* por posición del genoma (anexo 21). Por tal motivo solo se analizaron 23 muestras entre las comunidades de Libertad y Urcomiraño (ver anexo 22).

Se utilizaron 19 mil SNPs bi-alélicos para realizar los análisis de diversidad genómica. Los resultados muestran que la población de parásitos de la comunidad de Libertad tiene baja Heterocigocidad esperada (H_e) de 0.15, comparado con los parásitos de Urcomiraño que muestra mayor Heterocigocidad cerca 0.2 (ver figura 6). La prueba de Monte Carlo evidencia que no existen diferencias estadísticamente significativas (p -valor > 0.05) entre la H_e en ambas comunidades.

El Análisis de Componente Principal (ACP) evidencia una agrupación de parásitos colectados durante el 2022. Sin embargo, entre ambas comunidades no se observa una diferenciación, debido a que algunas muestras de Urcomiraño se agrupan con Libertad tal como se observan en las figuras 7 a y b.

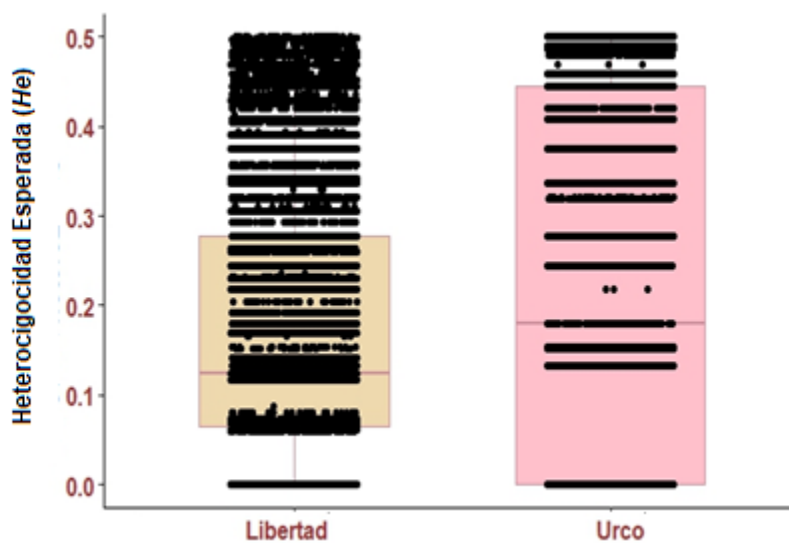
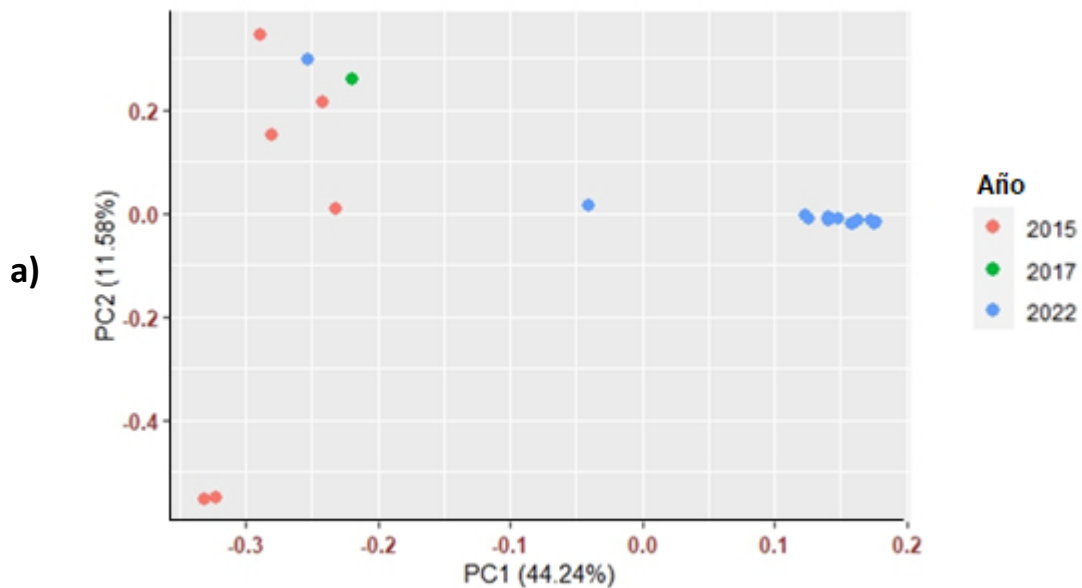


Figura 6: Diversidad genética entre comunidades.

Cada círculo representa un SNP o variantes de los parásitos colectados por cada comunidad, la línea de cada caja representa la mediana de la distribución de las variantes.



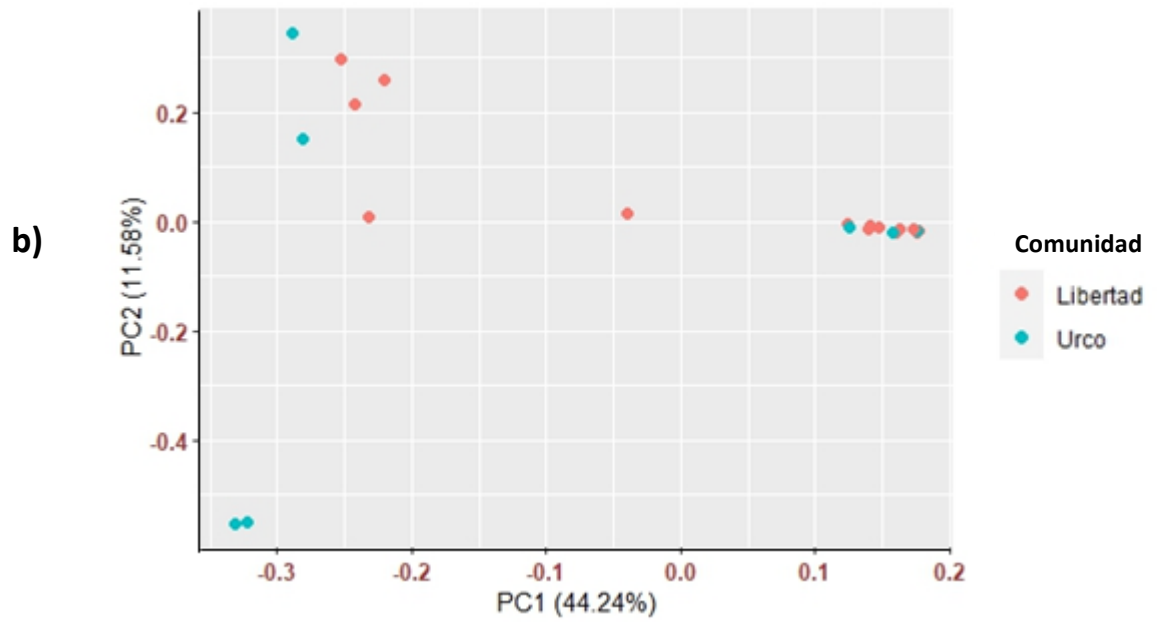


Figura 7: Análisis de componente principal por año y comunidad de colecta. La figura “a” representa el Principal componente entre los años de la colecta, el porcentaje en los paréntesis indica la proporción de la variación total explicada por cada coordenada principal. La figura “b” representa el análisis de componente principal entre comunidades

4.7 Diferenciación poblacional e identidad por descendencia de las poblaciones de parásitos de Libertad y Urcomiraño.

Los parásitos de las comunidades Libertad y Urcomiraño, durante el 2015 y 2017 mostraron algo de diferenciación poblacional ($F_{st}=0.06$) sugiriendo alto flujo genético entre ellos, pero este flujo no fue lo suficientemente fuerte para eliminar la diferenciación entre estas poblaciones. Adicional a esto, durante el 2015 y 2022 se observó un incremento de la diferenciación genética ($F_{st}=0.24$), duplicando su valor ($F_{st} = 0.56$) entre las poblaciones del 2017 y 2022 sugiriendo una disminución del flujo genético entre ellos, tal como se observa en la figura 8.

Por otro lado, se realizó el análisis de IBD y se evidenció que los parásitos del año 2022 están genéticamente relacionados, porque presentan regiones en sus genomas que provienen de un ancestro en común, sugiriendo que los parásitos de la comunidad de Libertad son clonales, tal como se observa en la figura 9.

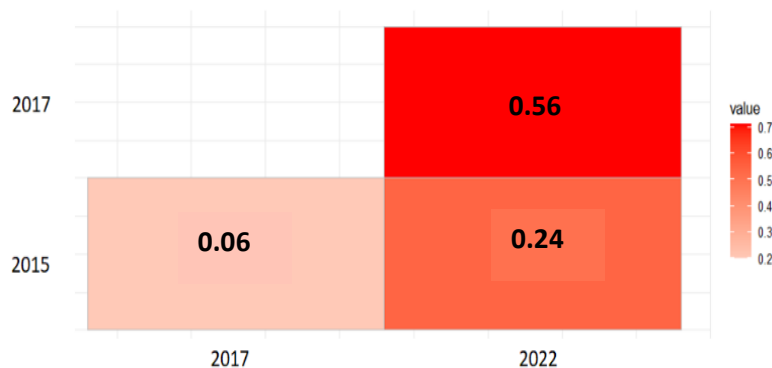


Figura 8: Diferenciación Poblacional (F_{st}) por año de colecta.

La escala de color representa el índice de diferenciación poblacional, esta escala va desde cero hasta uno, donde cero representa sin diferenciación poblacional y hasta uno muy alta diferenciación poblacional.

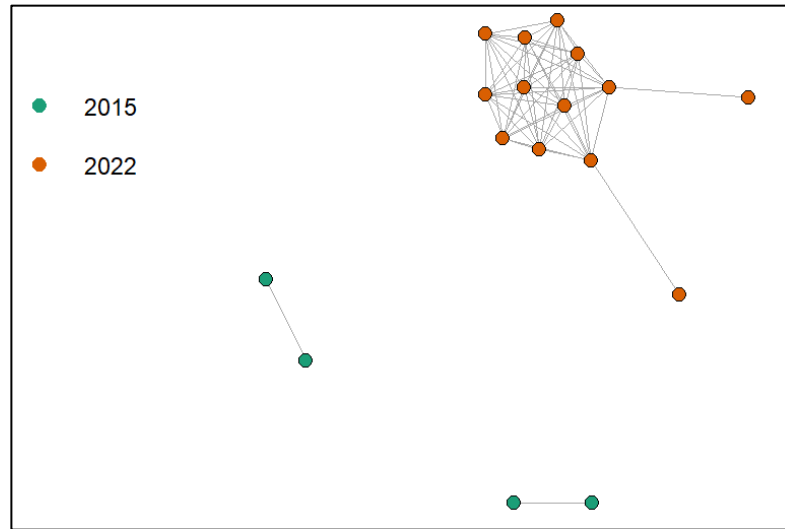


Figura 9: Análisis de IBD por año de colecta.

Cada círculo representa una muestra y los colores el año de colecta. Las líneas representan la pertenencia a un ancestro en común

4.8 Diferenciación poblacional F_{st} de Weir y Cocherham

Se encontró algo de diferenciación poblacional ($F_{st}=0.06$) entre los parásitos de la comunidad de Libertad y Urcomiraño, sugiriendo flujo genético entre ambas comunidades pese a su distancia geográfica. Luego se observó un incremento de la diferenciación poblacional ($F_{st} =0.14-0.19$) entre Libertad con Padre Cocha, Puerto América, San Juan, Santa Clara y Santo Tomás, esto debido a la presencia de barreras geográficas que disminuyó el flujo genético, lo mismo ocurrió entre Urcomiraño con Padre Cocha, Santa Clara, Santa Tomás, San Juan y Puerto América ($F_{st}\leq 0.15$), tal como se observa en figura 10.

En el año 2022 durante la ejecución del PMC se encontró mayor incremento de la diferenciación poblacional ($F_{st} > 0.27$) comparado con los parásitos colectados ente los años 2006-2008 y entre 2011-2015, sugiriendo disminución del flujo genético entre

estos años debido a las intervenciones realizadas por el programa PMC. Sin embargo, solo en el año 2010, tiempo donde terminó el programa PAMAFRO y antes del PMC, se encontró una menor diferenciación poblacional ($F_{st} < 0.06$), con incremento del flujo genético, esto debido a la ausencia de programas de control y eliminación durante el 2011 y 2017 (ver anexo 24a y 24b).

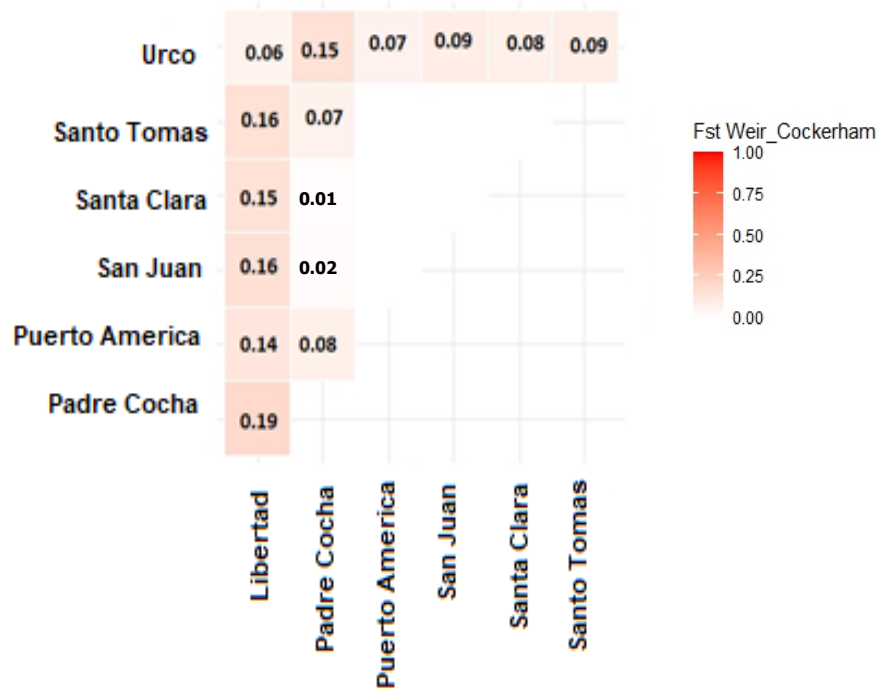


Figura 10: Diferenciación poblacional (F_{st}) por comunidad de colecta.

La escala de color representa el índice de diferenciación poblacional, esta escala va desde cero hasta uno. Donde cero representa sin diferenciación poblacional y uno diferenciación poblacional.

4.9 Estructuración Poblacional de *P. vivax*

Se encontró estructuración poblacional en las comunidades de Libertad y Urcomiraño durante los años de estudio. No se pudo establecer el número exacto de poblaciones de parásitos; sin embargo, se puede sugerir que están entre 3 a 6 poblaciones al presentar los valores más bajos de error (anexo 26). En base a esto se decidió graficar para un número de cinco poblaciones. Se encontró 5 poblaciones clonales compartidas entre Libertad y Urcomiraño y esto evidencia que pese a su distancia geográfica existe un linaje predominante de parásitos que se han mantenido, lo cual puede deberse a reciente migración o historia compartida de transmisión. Caso similar ocurre en las comunidades de Santa Juan, Santa Clara y Santo Tomas donde los linajes se están transmitiendo debido a su cercanía geográfica (ver figura 11). Durante el 2022 se encontró en su mayoría una sola población clonal de parásitos evidenciando cambios temporales de la estructura poblacional, a comparación con los años 2006-2008 donde circularon varios linajes (ver anexo 25a). Durante el PMC se observa una reducción de la población comparado con PAMAFRO y antes PMC (ver anexo 25b).

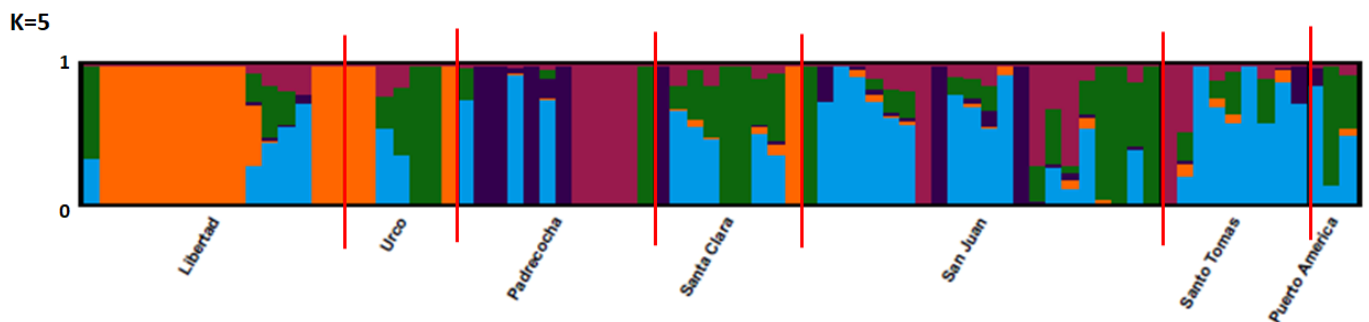


Figura 11: Estructuración poblacional de *P. vivax* por comunidad de colecta. Cada color representa una población del parásito, el eje X representa las comunidades de colecta. El eje Y indica la probabilidad de pertenencia a cada población. Cada color representa una población del parásito. Los valores de 0 a 1 indican la proporción de pertenencia a cada población.

4.10 Árbol filogenético construido con el método de Neighbor Joining (NJ) sin raíz

El árbol filogenético muestra similitud genética entre los parásitos colectados en Libertad y Urcomiraño (Urco), sumado a otro grupo que se vinculan con una muestra de Puerto América. Sin embargo, pese a su distancia geográfica entre estas comunidades se evidencia un flujo genético. Por otro lado, existe dos muestras de Libertad que se agruparon con muestras de San Juan, Padre Cocha y Puerto América (ver figura 12). Pese a la lejanía geográfica de estas comunidades se observa la conectividad promovida por la movilización humana que facilita la transmisión del parásito. Por otro lado, se observa que las muestras se agrupan de acuerdo al año de colecta como el 2022, lo mismo ocurrió con las muestras del 2006, 2007 y 2008. Sin embargo, una muestra del 2010 se agrupó con las del año 2015 que pertenecen a Urcomiraño. (ver anexo 26a).

Por otro lado, se observa la agrupación de la población de los parásitos por cada programa de control y eliminación de Malaria (ver anexo 26b). La población de parásitos colectados durante PMC, se agrupan en el mismo clúster, esto debido a las acciones realizadas por parte del PMC dentro de estas dos comunidades, del mismo modo ocurre en las muestras tomadas durante el programa PAMAFRO que permitió reducir los linajes por las intervenciones de control ocurridas durante el 2005-2010. Sin embargo, las muestras colectas antes del PMC son de diferentes linajes y se ubican en diferentes clusters esto debido a la ausencia de programas de control y eliminación.

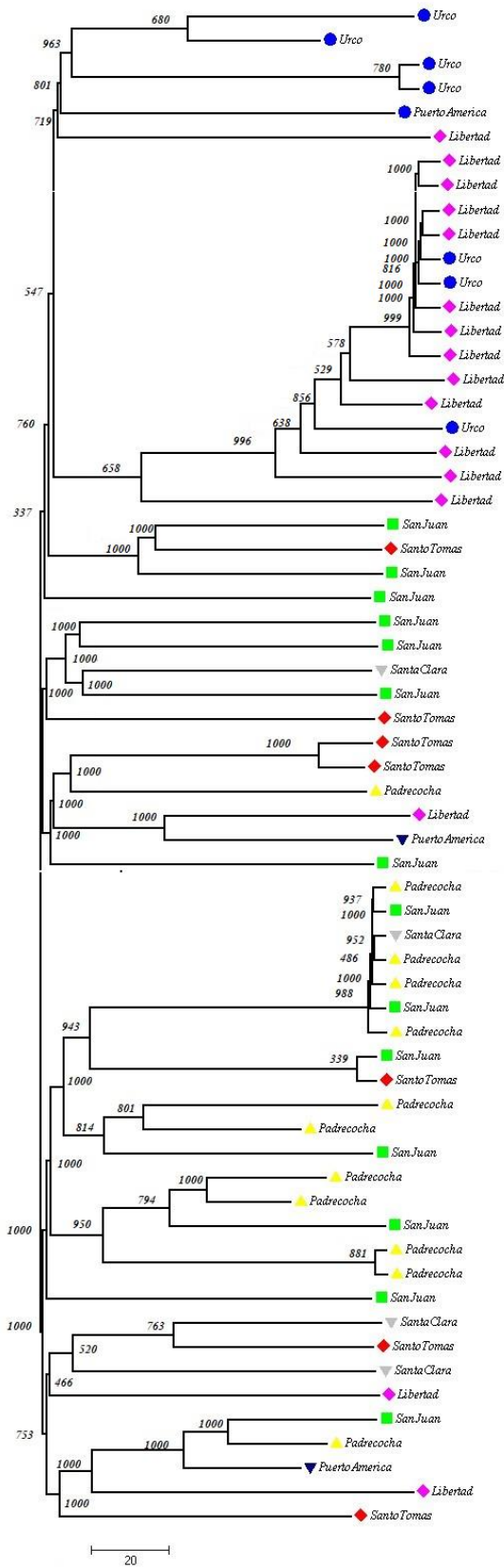


Figura 12 : Árbol filogenético de malaria colectadas por comunidad, construido a través del método de Neighbor Joining sin raíz. La distancia entre los taxones fue calculada en base a distancias Euclidianas y el soporte cada nodo se realizó mediante 1000 réplicas de Bootstrap. Las longitudes de las ramas indican la distancia genética entre taxones. El árbol se presenta sin raíz lo que implica que los taxones no están orientados evolutivamente.

4.11 Análisis de identidad por descendencia (IBD =90%)

Las muestras colectadas en el 2022 en la comunidad de Libertad y Urcomiraño se encuentran un IBD igual 90%, es decir que provienen de un ancestro en común y estas muestras aparentemente son una población clonal (ver figura 13a). Esto puede ser interpretado como algún efecto producido por las intervenciones realizadas por el Plan Malaria Cero que han causado cambio o reducción de las poblaciones de *P. vivax*. Resultado similar se encuentra en las muestras colectadas durante el 2007 y 2006-2008 años que se implementó PAMAFRO que causó efectos en las poblaciones de parásitos observándose poblaciones clonales, tal como se observa en la figura 13b y 13c.

Las muestras de San Juan, Santa Clara y Padre Cocha también mostraron pertenecer a un ancestro en común es decir son clonales, esto debido a su cercanía geográfica (ver figura 13b). Sin embargo, las muestras colectadas antes PMC en su mayoría no se encuentran en IBD y por lo tanto son linajes de diferentes orígenes tal como se observa en la figura 13c.

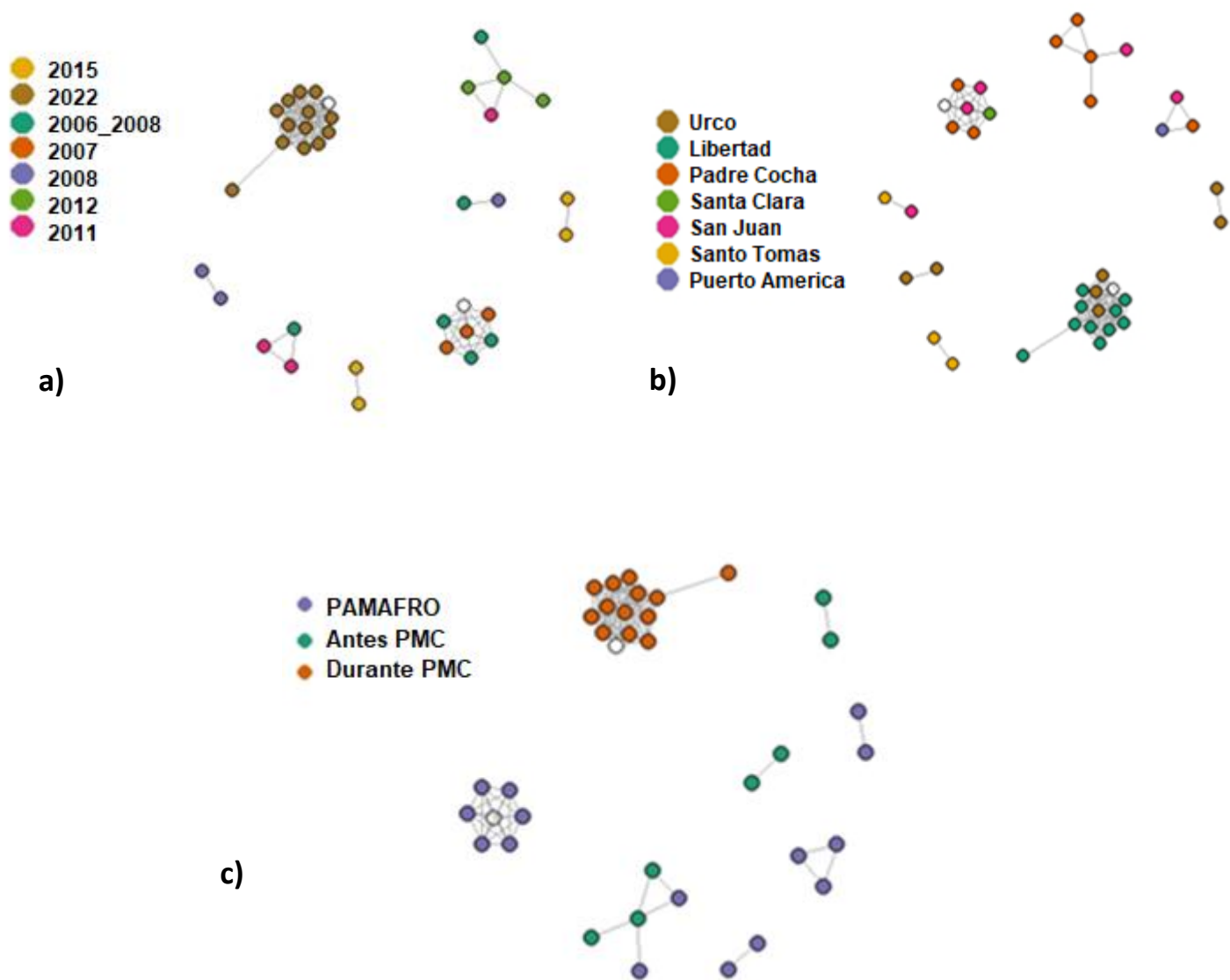


Figura 13 : Identidad por Descendencia (IBD) por año de colecta, comunidad y programa de control y eliminación. Cada círculo representa una muestra y cada color una característica asignada. Las líneas representan la distancia genética entre muestras

V. DISCUSIÓN

En este estudio se resalta que la movilización humana cumple un rol relevante en la transmisión de la malaria, esto se evidenció en el 21.0% de las infecciones encontradas en viajeros de las comunidades de Libertad y Urcomiraño, y su interconexión en su mayoría a Mazán e Iquitos junto a quebradas y sumado a esto, 89% de infecciones submicroscópicas. Estos hallazgos tienen una alta implicancia en la transmisión, debido a que estos factores estarían ayudando a explicar el mantenimiento de la transmisión de la malaria residual a nivel micro-epidemiológico.

Los hallazgos encontrados confirman que la cuenca de Mazán es un zona donde predomina la movilización de personas infectadas con *Plasmodium spp.*, y esta afirmación se refuerza en el 22.7% de infecciones en personas que reportaron viaje en el último mes (126), y como consecuencia, estarían contribuyendo con la transmisión del parásito dentro y entre las comunidades de Libertad y Urcomiraño. Sin embargo, este porcentaje de infecciones en viajeros encontrados en la Amazonia Peruana son contrastantes al comparar 77% de infecciones importadas por viajeros desde zonas rurales en Brasil (140), 0.4% desde Oceanía hacia China, y 95% importados entre países Africanos (27), evidenciando un patrón heterogéneo en los casos importados por viajeros a nivel de comunidades y entre continentes cercanos o lejanos.

En las comunidades amazónicas en general, los varones a temprana edad realizan actividades al aire libre como la agricultura, la pesca y los viajes para la extracción de madera (datos observados durante el censo), este comportamiento común permite una mayor exposición a la picadura del mosquito a temprana edad. Las características

mencionadas se corroboran con lo observado en este estudio, donde los varones y adolescentes (>15años) con viaje son factores de riesgo. Estos factores de riesgo encontrados también fueron reportados en estudios realizados en Nepal, China y Brasil, similar a esto se encontró en los diversos estudios desarrollados en la Amazonia peruana (5,19,83). Los viajes hacia otras comunidades explicarían la aparición de nuevos focos de transmisión o su mantenimiento, y como consecuencia la heterogeneidad de la transmisión, y esto ayuda a entender la micro-epidemiología local en cada comunidad.

La interconectividad entre comunidades y quebradas, promovidas por la movilización humana, ayuda a la dispersión geográfica del parásito a través del flujo genético, así como también, la aparición de los corredores biológicos. Estos corredores permiten el contacto entre diferentes zonas de transmisión. Estudios previos en Colombia y Perú señalaron la existencia de estos corredores biológicos (7,107). Un corredor biológico es un grupo de poblaciones conectados que permite el flujo genético entre ellos (7). Por lo tanto, focalizar estos corredores biológicos sería de vital importancia para interrumpir la transmisión, en este trabajo se hipotetiza que uno de los corredores biológicos sería entre la comunidad de Libertad y la quebrada Arahua, y la comunidad de Urcomiraño junto a la quebrada Armas. Sin embargo, es necesario realizar estudios de flujo genético o metapoblaciones entre estos lugares para corroborar esta hipótesis.

Otro hallazgo importante encontrado en este estudio fue el 89% de infecciones del tipo submicroscópicas que también estaría ayudando a explicar el mantenimiento de la

transmisión de la malaria residual. Este tipo de infecciones son características propias de las infecciones causadas por *P. vivax* reportados en diferentes países de Asia, Sudamérica y la Amazonia Peruana (4,5,48,112–114). La relevancia de encontrar en mayor cantidad este tipo de infecciones es que las herramientas de diagnóstico convencional usado por el MINSA no pueden detectar estas infecciones, y por tanto estarían escapando a la estrategia de la vigilancia y control. Por este motivo, es necesario implementar herramientas moleculares sensibles para ser usadas en zonas rurales de la Amazonia. Por ejemplo, LAMP es una herramienta molecular ideal para ser usada en campo y sumado a esto su alta sensibilidad y especificidad convirtiéndose en herramientas prometedoras para los programas de eliminación (115).

Los datos genómicos de la población de *P. vivax* en Libertad y Urcomiraño revelaron una baja diversidad genética, caracterizada por poblaciones clonales (IBD = 90%) y un incremento temporal en la diferenciación poblacional ($F_{st} = 0.06 - 0.56$), acompañado de una disminución del flujo genético. Estos cambios podrían atribuirse al confinamiento durante la emergencia sanitaria de 2020 o a la implementación del Plan Malaria Cero (2018-2022), que probablemente generaron un cierto grado de aislamiento geográfico. Como resultado, se observó una estructuración poblacional de linajes clonales que se siguen transmitiendo dentro de estas comunidades.

Los linajes clonales encontrados en el árbol de NJ sin raíz y el IBD pueden haberse generado por un cuello de botella y presión de selección en la población de *P. vivax*, probablemente estos eventos evolutivos han permitido que las poblaciones se vuelvan más clonales (55). El cuello de botella pudo haberse generado por la disminución de

casos a nivel histórico en la Amazonia Peruana producido durante la implementación del programa PAMAFRO (2005-2011) y un 75% de disminución de casos microscópicos durante el 2017-2020 debido al PMC (84).

El árbol de Neighbor-Joining (NJ) mostró que la mayoría de los parásitos se agruparon según la temporalidad y los programas de control establecidos (PAMAFRO y PMC). Sin embargo, antes del PMC (2011-2017), el MINSA se enfocaba únicamente en tratar infecciones sintomáticas, con acciones de control intermitentes. Esto facilitó la transmisión y dispersión de los parásitos, lo que explica la aparición de muestras colectadas antes del PMC en diferentes grupos genéticos. Esta dispersión también contribuye a la estructuración poblacional observada por año y estrategia de control, con parásitos provenientes de diversos orígenes y un incremento en la mezcla genética (admixture).

Por otro lado, se observa que muestras de Libertad (2022) se agrupan con muestras de Santo Tomás (2006-2008), San Juan (2008), Puerto América y Padre Cocha (2011), lo que sugiere que estos parásitos sobrevivieron al programa de control PAMAFRO y se dispersaron a través de infecciones asintomáticas o hipnozoitos. Los hipnozoitos, que permanecen latentes en el hígado del huésped humano, pueden reactivarse mucho tiempo después de la infección inicial, incluso años después de haber sido adquiridos. Esta capacidad de evadir el tratamiento y reactivarse refleja una importante adaptación del parásito, permitiéndole persistir en un entorno con constantes esfuerzos de eliminación y favoreciendo su transmisión.

Por otro lado, los datos indican que en Libertad, la comunidad con mayor movilización humana, se encontraron parásitos clonales y baja diversidad genómica, características que evidencian un contexto epidemiológico de eliminación de la malaria. Este escenario es similar a lo observado en estudios realizados en Panamá (79) y en la frontera entre China y Birmania (77), donde se detectaron poblaciones clonales de *P. vivax* con una diversidad genómica moderada.

Santa Emilia, Urcomiraño y Libertad comparten algunas características clave, como la presencia de infecciones submicroscópicas y una estructura poblacional compuesta por linajes de parásitos con diversos orígenes que se transmiten localmente. La movilización humana también juega un papel importante en la micro-epidemiología de estas comunidades.

En el caso de Santa Emilia, las intervenciones intermitentes no lograron reducir la transmisión, y la falta de un cuello de botella poblacional permitió la entrada de nuevos parásitos a través de la movilización humana, lo que favoreció el recambio de poblaciones. Por otro lado, programas de control como el PMC parecen haber contribuido a la presencia de linajes clonales en Urcomiraño y Libertad.

Finalmente, con la evidencia obtenida en este estudio, es necesario que el actual Plan Nacional hacia la eliminación de la malaria desarrolle estrategias de control más focalizadas, especialmente en viajeros y corredores biológicos. Además, la presencia de poblaciones clonales como parte de la malaria residual que confirma el contexto actual de eliminación en el que se encuentra Perú.

VI. CONCLUSIONES

- La movilización humana desempeña un papel crucial en la transmisión de la malaria, evidenciado por el 21% de los casos de malaria detectados en viajeros de las comunidades de Libertad y Urcomiraño. Además, el 89% de estas infecciones son submicroscópicas, lo que contribuye a mantener la micro-epidemiología de la transmisión residual en estas áreas.
- Los viajes realizados en el último mes, junto con la heterogeneidad en los patrones de movilidad hacia destinos clave como Mazán, Iquitos y otras quebradas, resaltan aspectos importantes de la micro-epidemiología de la malaria en Libertad y Urcomiraño. Esto sugiere que estos movimientos deben ser un enfoque prioritario en futuras estrategias de control.
- La baja diversidad genética y la alta clonalidad observada en los parásitos de Libertad y Urcomiraño sugieren que la estructura poblacional actual es diferente a la de los parásitos recolectados entre 2006 y 2015, lo que refleja cambios espaciales y temporales en las poblaciones de *Plasmodium vivax*. Estos cambios podrían estar asociados a las restricciones en la movilidad poblacional debido a programas de control como PAMAFRO y el Plan Malaria Cero, los cuales han generado cuellos de botella genéticos.

VII. CONCLUSIONES GENERALES DEL CAPÍTULO 1 y 2

- Las infecciones submicroscópicas son comunes en diversos contextos micro-epidemiológicos y en comunidades geográficamente dispersas, lo que favorece la transmisión de *Plasmodium vivax*. Estos individuos infectados, aunque asintomáticos o con baja carga parasitaria, podrían actuar como reservorios clave en la transmisión de la malaria.
- La movilización humana, especialmente los viajeros, juega un papel crucial en la transmisión de la malaria, convirtiéndose en un grupo de alto riesgo. Esto podría explicar la persistencia de la malaria en las comunidades de Libertad y Urcomiraño, lo que sugiere la necesidad de considerarlos en futuros planes de control de la malaria.
- La presencia de poblaciones clonales observadas en el estudio es un reflejo del estado epidemiológico de eliminación de la malaria en el Perú, subrayando los avances alcanzados en este proceso.

VIII. LIMITACIONES DEL ESTUDIO DEL CAPÍTULO 1 Y 2

- No se pudieron genotipificar todas las muestras positivas a *P. vivax* debido a la baja densidad parasitaria de las muestras colectadas en Santa Emilia. Sin embargo, genotipificar el 45% (240/529) de todas las muestras ofrece una buena cobertura de la comunidad, diversidad genética y para encontrar diferenciación poblacional. Por último, este número permitió superar el número mínimo necesario para realizar test de cuello de botella (30 muestras mínimas para detectar alelos raros).
- No se pudo secuenciar el genoma de todas las muestras de *P. vivax* debido a su baja parasitemia y las limitaciones técnicas actuales para poder enriquecer el genoma de las muestras. Sin embargo, evaluar cerca de 19 mil SNPs de 23 muestras e incorporar 42 genomas adicionales de diferentes lugares y tiempos, permitió encontrar diferenciación poblacional, explorar la diversidad genómica y las relaciones genéticas entre diferentes parásitos.
- No todas las personas dieron su consentimiento para participar en los dos estudios. Sin embargo, los barridos mensuales y la vigilancia semanal por tiempos consecutivos permitieron tener mayor cobertura de la información y los casos de malaria de las personas que participaron en el estudio.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. World Malaria Report [Internet]. Vol. WHO/HTM/GM, World Health. 2022. 238 p. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240064898>
2. MINSA. Sala de situación de salud. Ministerio de Salud. SE 09 [Internet]. 2024. Available from: https://www.dge.gob.pe/epipublic/uploads/asis-sala/asis-sala_20249_15_141222.pdf
3. Ministerio de salud. Casos de malaria por departamentos Perú 2015 [Internet]. Vol. I, Direccion General De Epidemiologia. Perú; 2015. Available from: <https://www.dge.gob.pe/portalnuevo/salas-situacionales/sala-de-situacion-nacional/>
4. 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* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2021 Jul 4];7(1):1–17. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-07818-0>
5. Rosas-Aguirre A, Guzman-Guzman M, Gamboa D, Chuquiyaui 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* [Internet]. 2017;16(1):1–19. Available from: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-017-1957-y>
6. Rosas-Aguirre, A., Guzman-Guzman, M., Chuquiyaui, R., Moreno, M., Manrique, P., Ramirez, R., Carrasco-Escobar, G., Rodriguez, H., Speybroeck, N., Conn, J. E., Gamboa, D., Vinetz, J. M., & Llanos-Cuentas A. Temporal and micro-spatial heterogeneity in transmission dynamics of co-endemic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* in two rural cohort populations in the Peruvian Amazon. *J Infect Dis* [Internet]. 2020;223(8):1466–1477. Available from: <https://europepmc.org/article/med/32822474>
7. Manrique P, Miranda-alban J, Alarcon-baldeon J. Microsatellite analysis reveals connectivity among geographically distant transmission zones of *Plasmodium vivax* in the Peruvian Amazon : A critical barrier to regional malaria elimination. 2019;(June 2014):1–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0007876>
8. MINSA. Sala de situación de salud [Internet]. Ministerio de Salud. 2023. Available from: https://www.dge.gob.pe/epipublic/uploads/asis-sala/asis-sala_202346_29_091229.pdf
9. Venugopal K, Hentzschel F, Valkiūnas G, Marti M. *Plasmodium* asexual growth and sexual development in the haematopoietic niche of the host. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2020;18(3):177–89. Available from:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31919479/>

10. Tavares J, Formaglio P, Thiberge S, Mordelet E, Van Rooijen N, Medvinsky A, et al. Role of host cell traversal by the malaria sporozoite during liver infection. *J Exp Med* [Internet]. 2013;210(5):905–15. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3646492/>
11. Flannery EL, Kangwanransan N, Chuenchob V, Roobsoong W, Fishbaugher M, Zhou K, et al. Plasmodium vivax latent liver infection is characterized by persistent hypnozoites, hypnozoite-derived schizonts, and time-dependent efficacy of primaquine. *Mol Ther - Methods Clin Dev* [Internet]. 2022;26(September):427–40. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2022.07.016>
12. Thomson-Luque R, Bautista JM. Home Sweet Home: Plasmodium vivax-Infected Reticulocytes—The Younger the Better? *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2021;11(May):1–9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.675156/full>
13. Sologub L, Kuehn A, Kern S, Przyborski J, Schillig R, Pradel G. Malaria proteases mediate inside-out egress of gametocytes from red blood cells following parasite transmission to the mosquito. *Cell Microbiol* [Internet]. 2011;13(6):897–912. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21501358/>
14. Bannister-Tyrrell M, Verdonck K, Hausmann-Muela S, Gryseels C, Muela Ribera J, Peeters Grietens K. Defining micro-epidemiology for malaria elimination: systematic review and meta-analysis. *Malar J* [Internet]. 2017;16(1):1–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28427389/>
15. Camargo M, Soto-De León SC, Del Río-Ospina L, Páez AC, González Z, González E, et al. Micro-epidemiology of mixed-species malaria infections in a rural population living in the Colombian Amazon region. *Sci Rep* [Internet]. 2018;8(1):1–14. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-23801-9>
16. Bannister-Tyrrell M, Xa NX, Kattenberg JH, Van Van N, Dung VKA, Hieu TM, et al. Micro-epidemiology of malaria in an elimination setting in Central Vietnam. *Malar J* [Internet]. 2018;17(1):1–15. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2262-0>
17. Bannister-Tyrrell M, Srun S, Sluydts V, Gryseels C, Mean V, Kim S, et al. Importance of household-level risk factors in explaining micro-epidemiology of asymptomatic malaria infections in Ratanakiri Province, Cambodia. *Sci Rep* [Internet]. 2018;8(1):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-30193-3>
18. Soto-Calle V, Rosas-Aguirre A, Llanos-Cuentas A, Abatih E, Dedeken R,

- Rodriguez H, et al. Spatio-Temporal analysis of malaria incidence in the Peruvian Amazon Region between 2002 and 2013. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Jan 16 [cited 2021 Apr 20];7. Available from: [/pmc/articles/PMC5238441/](https://doi.org/10.1038/s41598-017-06441-7)
19. 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*. 2020 Aug;223(8):1466–1477.
 20. Mosha JF, Lukole E, Charlwood JD, Wright A, Rowland M, Bullock O, et al. Risk factors for malaria infection prevalence and household vector density between mass distribution campaigns of long-lasting insecticidal nets in North-western Tanzania. *Malar J* [Internet]. 2020;19(1):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-020-03369-4>
 21. Sandfort M, Vantaux A, Kim S, Obadia T, Peppey A, Gardais S, et al. Forest malaria in Cambodia: the occupational and spatial clustering of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infection risk in a cross-sectional survey in Mondulkiri province, Cambodia. *Malar J* [Internet]. 2020;19(1):1–12. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-020-03482-4>
 22. Gari T, Solomon T, Lindtjørn B. Older children are at increased risk of *Plasmodium vivax* in south-central Ethiopia: a cohort study. *Malar J* [Internet]. 2021;20(1):1–9. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03790-3>
 23. Verdonschot PFM, Besse-Lototskaya AA. Flight distance of mosquitoes (*Culicidae*): A metadata analysis to support the management of barrier zones around rewetted and newly constructed wetlands. *Limnologica* [Internet]. 2014;45:69–79. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.limno.2013.11.002>
 24. Pindolia DK, Garcia AJ, Wesolowski A, Smith DL, Buckee CO, Noor AM, et al. Human movement data for malaria control and elimination strategic planning. *Malar J* [Internet]. 2012;11:1–16. Available from: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-11-205>
 25. Moreno M, Saavedra MP, Bickersmith SA, Lainhart W, Tong C, Alava F, et al. Implications for changes in *Anopheles darlingi* biting behaviour in three communities in the peri - Iquitos region of Amazonian Peru. *Malar J* [Internet]. 2015;14(290):1–11. Available from: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-015-0804-2>
 26. Wesolowski A, Buckee CO, Pindolia DK, Eagle N, Smith DL, Garcia AJ, et al. The Use of Census Migration Data to Approximate Human Movement Patterns across Temporal Scales. *PLoS One* [Internet]. 2013 Jan 9 [cited 2021 Jun 21];8(1):52971. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0052971#:~:text=The long term movements captured,a given population may be>

27. Yu T, Fu Y, Kong X, Liu X, Yan G, Wang Y. Epidemiological characteristics of imported malaria in Shandong Province, China, from 2012 to 2017. *Sci Rep* [Internet]. 2020;10(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-64593-1>
28. Tatem AJ, Smitha DL. International population movements and regional *Plasmodium falciparum* malaria elimination strategies. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2010;107(27):12222–7. Available from: <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.1002971107>
29. Pindolia DK, Garcia AJ, Huang Z, Smith DL, Alegana VA, Noor AM, et al. The demographics of human and malaria movement and migration patterns in East Africa. *Malar J* [Internet]. 2013;12(1):1–12. Available from: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-12-397>
30. Carrasco-Escobar G, Matta-Chuquisapon J, Manrique E, Ruiz-Cabrejos J, Barboza JL, Wong D, et al. Quantifying the effect of human population mobility on malaria risk in the Peruvian Amazon. *R Soc Open Sci* [Internet]. 2022;9(7). Available from: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsos.211611>
31. Chuquiyauri R, Paredes M, Peñataro P, Torres S, Marin S, Tenorio A, et al. Socio-demographics and the development of malaria elimination strategies in the low transmission setting. *Acta Trop* [Internet]. 2012 Mar [cited 2021 Jun 21];121(3):292–302. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3294046/>
32. Carrasco-Escobar G, Castro MC, Barboza JL, Ruiz-Cabrejos J, Llanos-Cuentas A, Vinetz JM, et al. Use of open mobile mapping tool to assess human mobility traceability in rural offline populations with contrasting malaria dynamics. *PeerJ*. 2019;2019(1):1–13.
33. Nicoletti M. Three scenarios in insect-borne diseases. In: *Three scenarios in insect-borne diseases in the 21st century* [Internet]. Academic Press; 2020. p. 99–251. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012818706700005X?via%3Dihub>
34. da Silva-Nunes M, Moreno M, Conn JE, Gamboa D, Abeles S, Vinetz JM, et al. Amazonian malaria: Asymptomatic human reservoirs, diagnostic challenges, environmentally driven changes in mosquito vector populations, and the mandate for sustainable control strategies. *Acta Trop* [Internet]. 2012;121(3):281–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.10.001>
35. Prussing C, Moreno M, Saavedra MP, Bickersmith SA, Gamboa D, Alava F, et al. Decreasing proportion of *Anopheles darlingi* biting outdoors between long-lasting insecticidal net distributions in peri-Iquitos, Amazonian Peru. *Malar J* [Internet]. 2018;17(1):1–14. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936->

018-2234-4

36. Saavedra MP, Conn JE, Alava F, Carrasco-Escobar G, Prussing C, Bickersmith SA, et al. Higher risk of malaria transmission outdoors than indoors by *Nyssorhynchus darlingi* in riverine communities in the Peruvian Amazon. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2019;12(1):1–15. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3619-0>
37. Lin JT, Saunders DL, Meshnick SR. The role of submicroscopic parasitemia in malaria transmission: what is the evidence? *Trends Parasitol* [Internet]. 2014;30(4):183–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2014.02.004>
38. Lindblade KA, Steinhardt L, Samuels A, Kachur SP, Slutsker L. The silent threat: Asymptomatic parasitemia and malaria transmission. *Expert Rev Anti Infect Ther* [Internet]. 2013;11(6):623–39. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/eri.13.45>
39. WHO. WHO malaria terminology [Internet]. Global Malaria Programme. World Health Organization; 2019 [cited 2021 Apr 20]. Available from: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/malaria-terminology/en/>
40. Chen I, Clarke SE, Gosling R, Hamainza B, Killeen G, Magill A, et al. “Asymptomatic” Malaria: A Chronic and Debilitating Infection That Should Be Treated. *PLoS Med* [Internet]. 2016;13(1):1–11. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4718522/#:~:text=Because low-density infections are,and society as a whole.>
41. Sattabongkot J, Suansomjit C, Nguitragool W, Sirichaisinthop J, Warit S, Tiensuwan M, et al. Prevalence of asymptomatic *Plasmodium* infections with sub-microscopic parasite densities in the northwestern border of Thailand: A potential threat to malaria elimination. *Malar J* [Internet]. 2018;17(1):1–12. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2476-1>
42. Wamae K, Wambua J, Nyangweso G, Mwambingu G, Osier F, Ndung’U F, et al. Transmission and age impact the risk of developing febrile malaria in children with asymptomatic *plasmodium falciparum* parasitemia. *J Infect Dis*. 2019;219(6):936–44.
43. Ramírez-Olivencia G, Rubio JM, Rivas P, Subirats M, Herrero MD, Lago M, et al. Imported submicroscopic malaria in Madrid. *Malar J* [Internet]. 2012;11:1–8. Available from: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-11-324>
44. Cheaveau J, Mogollon DC, Mohon MAN, Golassa L, Yewhalaw D, Pillai DR. Asymptomatic malaria in the clinical and public health context. *Expert Rev Anti Infect Ther* [Internet]. 2019;17(12):997–1010. Available from: <https://doi.org/10.1080/14787210.2019.1693259>
45. van Eijk AM, Sutton PL, Ramanathapuram L, Sullivan SA, Kanagaraj D, Priya

- GSL, et al. The burden of submicroscopic and asymptomatic malaria in India revealed from epidemiology studies at three varied transmission sites in India. *Sci Rep* [Internet]. 2019;9(1):1–11. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-53386-w>
46. Nguyen TN, von Seidlein L, Nguyen TV, Truong PN, Hung S Do, Pham HT, et al. The persistence and oscillations of submicroscopic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections over time in Vietnam: an open cohort study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2018;18(5):565–72. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30046-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30046-X)
 47. Pava Z, Burdam FH, Handayani I, Trianty L, Utami RAS, Tirta YK, et al. Submicroscopic and asymptomatic plasmodium parasitaemia associated with significant risk of anaemia in Papua, Indonesia. *PLoS One* [Internet]. 2016;11(10):1–17. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0165340>
 48. Vallejo AF, Chaparro PE, Benavides Y, Álvarez Á, Quintero JP, Padilla J, et al. High prevalence of sub-microscopic infections in Colombia. *Malar J* [Internet]. 2015;14(1):1–7. Available from: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-015-0711-6>
 49. Xu P, Jiang Y, Xu J, Li J, Sun X. Genomics in the common carp [Internet]. 1st ed. *Genomics in Aquaculture*. Elsevier Inc.; 2016. 247–274 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801418-9/00010-X>
 50. Waples RS, Gaggiotti O. What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Mol Ecol* [Internet]. 2006;15(6):1419–39. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16629801/>
 51. Daniel L. Hartl. *A primer of population genetics and genomics*. 4th ed. United Kingdom: Oxford University Press; 2020. 296 p.
 52. Vega MP de la. Marcadores Moleculares, Variabilidad Genética y Evolución. In: *III Simposio Científico en Biología Celular y Molecular* [Internet]. España; 1997. p. 247–66. Available from: <https://core.ac.uk/download/pdf/61905769.pdf>
 53. Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1973;70(12 (I)):3321–3. Available from: <https://www.pnas.org/doi/pdf/10.1073/pnas.70.12.3321>
 54. Slatkin M. Linkage disequilibrium - understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2008;9(6):477–85. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5124487/pdf/nihms-831771.pdf>
 55. 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* [Internet]. 2015;93(3):79–86. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4574277/>
56. Haasl RJ, Payseur BA. The number of alleles at a microsatellite defines the allele frequency spectrum and facilitates fast accurate estimation of θ . *Mol Biol Evol*. 2010;27(12):2702–15.
 57. Kimmel M, Chakraborty R, King JP, Bamshad M, Watkins WS, Jorde LB. Signatures of population expansion in microsatellite repeat data. *Genetics*. 1998;148(4):1921–30.
 58. Zhong D, Koepfli C, Cui L, Yan G. Molecular approaches to determine the multiplicity of *Plasmodium* infections. *Malar J* [Internet]. 2018;17(1):1–9. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2322-5>
 59. Jost L. GST and its relatives do not measure differentiation. *Mol Ecol* [Internet]. 2008;17(18):4015–26. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1365-294X.2008.03887.x>
 60. Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* [Internet]. 1992;131(2):479–91. Available from: <https://academic.oup.com/genetics/article/131/2/479/6007328>
 61. Bennett RA, Thiagarajah MR, King JR, Rahman MH. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Euphytica* [Internet]. 2000;164(2):593–601. Available from: <https://academic.oup.com/genetics/article/155/2/945/6048111>
 62. Liu Y, Auburn S, Cao J, Trimarsanto H, Zhou H, Gray KA, et al. Genetic diversity and population structure of *Plasmodium vivax* in Central China. *Malar J* [Internet]. 2014;13(1):1–12. Available from: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-13-262>
 63. Koepfli C, Rodrigues PT, Antao T, Orjuela-Sánchez P, van den Eede P, Gamboa D, et al. *Plasmodium vivax* diversity and population structure across four continents. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2015;9(6):1–23. Available from: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003872>
 64. 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* [Internet]. 2016;10(1):1–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004376>
 65. 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;9(1):1–12.
66. Satam H, Joshi K, Mangrolia U, Waghoo S, Zaidi G, Rawool S, et al. Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. *Biology (Basel)* [Internet]. 2023;12(997):1–25. Available from: https://www.google.com/search?q=Next-Generation+Sequencing+Technology%3A+Current+Trends+and+Advancements&rlz=1C1CHBF_esPE1072PE1072&oq=Next-Generation+Sequencing+Technology%3A+Current+Trends+and+Advancements&gs_lcrp=EgZjaHJvbWUyBggAEEUYOdIBCDEwOTRqMGo3qAI
 67. Rhoads A, Au KF. PacBio Sequencing and Its Applications. *Genomics Proteomics Bioinformatics* [Internet]. 2015;13(5):278–89. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gpb.2015.08.002>
 68. Barton E, Slatko, Andrew F, Gardner and FMA. Overview of Next Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol* [Internet]. 2018;122(1):1–15. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6020069/pdf/nihms952860.pdf>
 69. Sutanto E, Pava Z, Echeverry DF, Lopera-Mesa TM, Montenegro LM, Yasnot-Acosta MF, et al. Genomics of *Plasmodium vivax* in Colombia reveals evidence of local bottle-necking and inter-country connectivity in the Americas. *Sci Rep* [Internet]. 2023;13(1):1–17. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-46076-1>
 70. Popovici J, Friedrich LR, Kim S, Bin S, Run V, Lek D, et al. Genomic analyses reveal the common occurrence and complexity of *plasmodium vivax* relapses in cambodia. *MBio* [Internet]. 2018;9(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29362233/>
 71. Ma J, Amos CI. Principal components analysis of population admixture. *PLoS One* [Internet]. 2012;7(7). Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0040115>
 72. Elhaik E. Principal Component Analyses (PCA)-based findings in population genetic studies are highly biased and must be reevaluated [Internet]. 12th ed. Vol. 12, *Scientific Reports*. Nature Publishing Group UK; 2022. 1–35 p. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14395-4>
 73. Taylor AR, Schaffner SF, Cerqueira GC, Nkhoma SC, Anderson TJC, Sriprawat K, et al. Quantifying connectivity between local *Plasmodium falciparum* malaria parasite populations using identity by descent. *PLoS Genet* [Internet]. 2017;13(10):1–20. Available from: <https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1007065>
 74. 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* [Internet]. 2018;14(5):1–31. Available from: <https://journals.plos.org/plosgenetics/article/file?id=10.1371/journal.pgen.1007279&type=printable>
75. Scott AD, Baum DA. Phylogenetic Tree. *Encycl Evol Biol* [Internet]. 2016;3:270–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128000496002031>
 76. Choudhuri S. Bioinformatics for Beginners: Genes, Genomes, Molecular Evolution, Databases and Analytical Tools. In: *Bioinformatics for Beginners: Genes, Genomes, Molecular Evolution, Databases and Analytical Tools* [Internet]. 1st ed. Academic Press; 2014. p. 1–225. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780124104716000098>
 77. Brashear AM, Fan Q, Hu Y, Li Y, Zhao Y, Wang Z, et al. Population genomics identifies a distinct plasmodium vivax population on the china-myanmar border of southeast asia. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2020;14(8):1–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0008506>
 78. 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* [Internet]. 2018;9(1):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-04965-4>
 79. Buyon LE, Santamaria AM, Early AM, Quijada M, Barahona I, Lasso J, et al. Population genomics of Plasmodium vivax in Panama to assess the risk of case importation on malaria elimination. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2020;14(12):e0008962. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0008962>
 80. Ibrahim A, Manko E, Dombrowski JG, Campos M, Benavente ED, Nolder D, et al. Population-based genomic study of Plasmodium vivax malaria in seven Brazilian states and across South America. *Lancet Reg Heal - Am* [Internet]. 2023;18(January):100420. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lana.2022.100420>
 81. de Oliveira TC, Corder RM, Early A, Rodrigues PT, Ladeia-Andrade S, Alves JMP, et al. Population genomics reveals the expansion of highly inbred plasmodium vivax lineages in the main malaria hotspot of Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2020;14(10):1–16. Available from: <https://journals.plos.org/plosntds/article/file?id=10.1371/journal.pntd.0008808&type=printable>
 82. Organismo Andino de Salud. PAMAFRO. Compartiendo lecciones aprendidas. Proyecto Control de la malaria en las zonas fronterizas de la región andina: Un enfoque comunitario-PAMAFRO. [Internet]. PANAMA; 2011. Available from:

<https://www.paho.org/es/documentos/compartiendo-lecciones-aprendidas-proyecto-control-malaria-zonas-fronterizas-region>

83. Joaquin C. Gomez. El rol de la movilización humana en la transmisión de la malaria en dos cuencas del distrito amazónico de Mazán. 2022 [cited 2023 Jan 16]; Available from: <https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/11542>
84. Ministerio de Salud- Peru. Documento Técnico: Plan Hacia la Eliminación de la Malaria en el Perú 2022 - 2030 [Internet]. Perú; 2022. Available from: [http://bvs.minsa.gob.pe/local/fi-admin/RM-034-2022 Minsa.pdf](http://bvs.minsa.gob.pe/local/fi-admin/RM-034-2022%20Minsa.pdf)
85. MINSA. Sala de situación de salud [Internet]. Ministerio de Salud. Perú; 2023. Available from: https://www.dge.gob.pe/epipublic/uploads/asis-sala/asis-sala_202346_29_091229.pdf
86. Imwong M, Nair S, Pukrittayakamee S, Sudimack D, Williams JT, Mayxay M, et al. Contrasting genetic structure in *Plasmodium vivax* populations from Asia and South America. *Int J Parasitol.* 2007;37(8–9):1013–22.
87. 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* [Internet]. 2014 Jan 6 [cited 2022 May 14];13(1):1–12. Available from: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-13-8>
88. Congpuong K, Ubalee R. Population genetics of *Plasmodium vivax* in four high malaria endemic areas in Thailand. *Korean J Parasitol.* 2017;55(5):465–72.
89. Dewasurendra RL, Baniecki ML, Schaffner S, Siriwardena Y, Moon J, Doshi R, et al. Use of a *Plasmodium vivax* genetic barcode for genomic surveillance and parasite tracking in Sri Lanka. *Malar J* 2020 191 [Internet]. 2020 Sep 21 [cited 2021 Nov 4];19(1):1–11. Available from: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-020-03386-3>
90. Julio Jorge Miranda Alban. Análisis de la Diversidad Genética y Estructura Genética - Poblacional de *Plasmodium vivax* en Santa Emilia (Iquitos - Loreto) a partir de Marcadores Microsatélites. [Internet]. Universidad Mayor de San Marcos; 2017. Available from: <https://www.semanticscholar.org/paper/Análisis-de-la-diversidad-genética-y-estructura-de-Alban-Jorge/3b99840924f5269a1d12e8e1465eeaef38c423e2>
91. Ministerio de Salud. Dirección General de Salud de las Personas. Norma Técnica De Salud Para La Atención De La Malaria Y Malaria Grave En El Perú. 2015;1(October 2013):1–224. Available from: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/4373.pdf>

92. Salud M de. Manual de Procedimientos de Laboratorio Para el diagnostico de Malara. Series de Normas Técnicas N 39. 2003;112. Available from: <https://www.gob.pe/institucion/minsa/informes-publicaciones/353447-manual-de-procedimientos-de-laboratorio-para-el-diagnostico-de-malaria>
93. Mangold KA, Manson RU, Koay ESC, Stephens L, Regner M, Thomson RB, et al. Real-Time PCR for Detection and Identification of Plasmodium spp . 2005;43(5):2435–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15872277/>
94. 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. 2017; Available from: <https://github.com/eclarke/swga>;
95. N. D. KARUNAWEERA, M. U. FERREIRA DLH and DFW. Fourteen polymorphic microsatellite DNA markers for the human malaria parasite Plasmodium vivax. Mol Ecol Notes [Internet]. 2007;7(1):172–5. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1471-8286.2006.01534.x>
96. Imwong M, Sudimack D, Pukrittayakamee S, Osorio L, Carlton JM, Day NPJ, et al. Microsatellite Variation , Repeat Array Length , and Population History of Plasmodium vivax. 2005;(Ellegren 2004):2004–6.
97. Alarcon-baldeon J. Dinámica de las Parasitemias recurrentes de Plasmodium vivax determinadas por PCR en pobladores de las comunidades de San José de Lupuna y Cahuide de la región Loreto. Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2016.
98. Abukari Z, Okonu R, Nyarko SB, Lo AC, Dieng CC, Salifu SP, et al. The diversity, multiplicity of infection and population structure of P. Falciparum parasites circulating in asymptomatic carriers living in high and low malaria transmission settings of Ghana. Genes (Basel) [Internet]. 2019;10(6):1–14. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6628376/>
99. Piry S, Luikart G, Cornuet JM. BOTTLENECK: A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. J Hered. 1999 Jul;90(4):502–3.
100. Winter DJ. MMOD: An R library for the calculation of population differentiation statistics. Mol Ecol Resour [Internet]. 2012;12(6):1158–60. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1755-0998.2012.03174.x>
101. Dray S, Dufour AB. The ade4 package: Implementing the duality diagram for ecologists. J Stat Softw [Internet]. 2007;22(4):1–20. Available from: <https://www.jstatsoft.org/article/view/v022i04>
102. Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. Mol Ecol [Internet].

- 2005;14(8):2611–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15969739/>
103. Earl DA, vonHoldt BM. STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resour.* 2012;4(2):359–61.
 104. Kopelman Naama M;Mayzel, Jonathan; Jakobsson, Mattias; Rosenberg NAM. “CLUMPAK: a program for identifying clustering modes and packing population structure inferences across K.” *Mol Ecol Resour* [Internet]. 15(1):1179–91. Available from: <http://clumpak.tau.ac.il/help.html>
 105. Alexander DH, Lange K. Enhancements to the ADMIXTURE algorithm for individual ancestry estimation. *BMC Bioinformatics* [Internet]. 2011;12(1):246. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/12/246>
 106. Kittichai V, Koepfli C, Nguitragool W, Sattabongkot J, Cui L. Substantial population structure of *Plasmodium vivax* in Thailand facilitates identification of the sources of residual transmission. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2017;11(10):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0005930>
 107. Pacheco MA, Schneider KA, Céspedes N, Herrera S, Arévalo-Herrera M, Escalante AA. Limited differentiation among *Plasmodium vivax* populations from the northwest and to the south Pacific Coast of Colombia: A malaria corridor? *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2018;13(3):1–18. Available from: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0007310>
 108. Ferreira MU, Karunaweera ND, Da Silva-Nunes M, Da Silva NS, Wirth DF, Hartl DL. Population structure and transmission dynamics of *Plasmodium vivax* in rural Amazonia. *J Infect Dis* [Internet]. 2007;195(8):1218–26. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article/195/8/1218/818713>
 109. Pacheco MA, Forero-Penã DA, Schneider KA, Chavero M, Gamardo A, Figuera L, et al. Malaria in Venezuela: Changes in the complexity of infection reflects the increment in transmission intensity. *Malar J* [Internet]. 2020;19(1):1–15. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-020-03247-z>
 110. Van Den Eede P, Erhart A, Van Der Auwera G, Van Overmeir C, Thang ND, Hung LX, et al. High complexity of *Plasmodium vivax* infections in symptomatic patients from a rural community in central Vietnam detected by microsatellite genotyping. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2010;82(2):223–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2813161/>
 111. Lim C, Pereira L, Saliba KS, Mascarenhas A, Maki JN, Chery L, et al. Reticulocyte Preference and Stage Development of *Plasmodium vivax* Isolates. *J Infect Dis* [Internet]. 2016;214(7):1081–4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5021230/>

112. Jiram AI, Ooi CH, Rubio JM, Hisam S, Karnan G, Sukor NM, et al. Evidence of asymptomatic submicroscopic malaria in low transmission areas in Belaga district, Kapit division, Sarawak, Malaysia. *Malar J* [Internet]. 2019;18(1):1–12. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2786-y>
113. Carrasco-Escobar G, Miranda-Alban J, Fernandez-Miñope C, Brouwer KC, Torres K, Calderon M, et al. High prevalence of very-low *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* parasitaemia carriers in the Peruvian Amazon: Insights into local and occupational mobility-related transmission. *Malar J* [Internet]. 2017;16(1):1–15. Available from: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-017-2063-x>
114. Rovira-vallbona E, Jose J. Predominance of asymptomatic and sub- microscopic infections characterizes the *Plasmodium* gametocyte reservoir in the Peruvian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2017;11(7):1–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28671944/>
115. Nolasco O, Infante B, Contreras-mancilla J, Incardona S, Ding XC, Gamboa D, et al. Diagnosis of *Plasmodium vivax* by Loop-Mediated Isothermal Amplification in Febrile Patient Samples from Loreto , Peru. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2020;103(4):1549–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32748776/>
116. 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* [Internet]. 2021;20(1):1–13. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03753-8>
117. Lo E, Zhou G, Oo W, Lee MC, Baum E, Felgner PL, et al. Molecular inference of sources and spreading patterns of *Plasmodium falciparum* malaria parasites in internally displaced persons settlements in Myanmar-China border area. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2015;33:189–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2015.05.002>
118. Martens P, Hall L. Malaria on the move: Human population movement and malaria transmission [Internet]. Vol. 6, *Emerging Infectious Diseases*. Centers for Disease Control and Prevention (CDC); 2000 [cited 2021 Jun 21]. p. 103–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2640853/>
119. Gunawardena S, Ferreira MU, Kapilananda GM, Wirth DF KN. The Sri Lankan paradox: high genetic diversity in *Plasmodium vivax* populations despite decreasing levels of malaria transmission. *Parasitology* [Internet]. 2014;141:880–90. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7485621/>
120. Abdullah NR, Barber BE, William T, Norahmad NA, Satsu UR, Muniandy PK, et al. *Plasmodium vivax* population structure and transmission dynamics in Sabah Malaysia. *PLoS One*. 2013;8(12):1–10.

121. Gerencia Regional de Salud Loreto. Portal de Transparencia Estandar. Red de Salud Loreto Nauta. Unidad Ejecutora 407 [Internet]. 2023. Available from: <https://geresaloreto.gob.pe/>
122. Vasquez ODHA, Enf L, Elvira J, Perez V. Gerencia Regional de Salud Loreto. Centro de Prevención y Control de Enfermedades. Boletín Epidemiológico N° 29. Julio 2023. [Internet]. 2023. p. 115–6. Available from: https://geresaloreto.gob.pe/storage/boletin_epidemiologico/BOLETÍN_29_2023_1690828703.pdf
123. Battle KE, Lucas TCD, Nguyen M, Howes RE, Nandi AK, Twohig KA, et al. Mapping the global endemicity and clinical burden of *Plasmodium vivax*, 2000–17: a spatial and temporal modelling study. *Lancet* [Internet]. 2019;394(10195):332–43. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31096-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31096-7)
124. Ministerio de Salud- Peru. Plan Malaria Cero. Periodo 2017-2021. Plataforma Digital Única del Estado Peruano [Internet]. 2017 Apr 21;17. Available from: https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/190350/189846_RM_244-2017-MINSA.PDF20180823-24725-1yk3i0y.PDF?v=1593748780
125. Killeen GF. Characterizing, controlling and eliminating residual malaria transmission. *Malar J*. 2014;13(1):1–22.
126. Manrique Valverde P. Epidemiología Molecular de *Plasmodium vivax* en cuatro comunidades riverieñas del Distrito de Mazan en la Amazonia Peruana [Internet]. Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2018. Available from: <https://hdl.handle.net/20.500.12866/3671>
127. Escalante A, Vallejo AF, Herrera S, Arévalo-herrera M. dispersal and drug resistance in *Plasmodium vivax*. 2017;48(8):953–8.
128. Cowell AN, Valdivia HO, Bishop DK, Winzeler EA. Exploration of *Plasmodium vivax* transmission dynamics and recurrent infections in the Peruvian Amazon using whole genome sequencing. *Genome Med*. 2018;10(1):1–12.
129. Rougemont M, Saanen M Van, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, Jatón K. Detection of Four *Plasmodium* Species in Blood from Humans by 18S rRNA Gene Subunit-Based and Species-Specific Real-Time PCR Assays. 2004;42(12):5636–43.
130. Gómez-Déniz E, Calderín-Ojeda E, Gómez HW. Asymmetric versus Symmetric Binary Regression: A New Proposal with Applications. *Symmetry (Basel)* [Internet]. 2022;14(4):1–13. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-8994/14/4/733>
131. Meulenaere K De, Cuypers B, Gamboa D, Laukens K, Rosanas-Urgell A. A new *Plasmodium vivax* reference genome for South American isolates. *BMC Genomics* [Internet]. 2023;24(606). Available from:

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.03.14.532329v2>
<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.03.14.532329v2.abstract>

132. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009;25(14):1754–60.
133. By Broad Institute. Picard Tools [Internet]. 2014. Available from: <https://broadinstitute.github.io/picard/>
134. Quinlan AR, Hall IM. BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* [Internet]. 2010;26(6):841–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20110278/>
135. McKenna A, Matthew Hanna, Eric Banks, Andrey Sivachenko KC, Andrew Kernysky, Kiran Garimella, David Altshuler, Stacey Gabriel MD, DePristo and MA. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* [Internet]. 2010;20(9):1297–303. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20644199/>
136. Poplin R, Ruano-Rubio, Valentin DePristo MA, Fennell TJ, O Carneiro M, Van der Auwera GA, Kling DE, et al. Scaling accurate genetic variant discovery to tens of thousands of samples. *BioRxIV*. 2018;1–22.
137. Broad Institute. Hard-filtering germline short variants GATK [Internet]. 2023. Available from: <https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us/articles/360035890471-Hard-filtering-germline-short-variants>
138. Otto TD, Böhme U, Sanders M, Reid A, Bruske EI, Duffy CW, et al. Long read assemblies of geographically dispersed *Plasmodium falciparum* isolates reveal highly structured subtelomeres. *Wellcome Open Res* [Internet]. 2018;3(May):1–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29862326/>
139. Danecek P, Auton A, Abecasis G, Albers CA, Banks E, DePristo MA, et al. The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*. 2011;27(15):2156–8.
140. Johansen IC, Rodrigues PT, Ferreira MU. Human mobility and urban malaria risk in the main transmission hotspot of Amazonian Brazil. *PLoS One* [Internet]. 2020;15(11 November):1–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0242357>

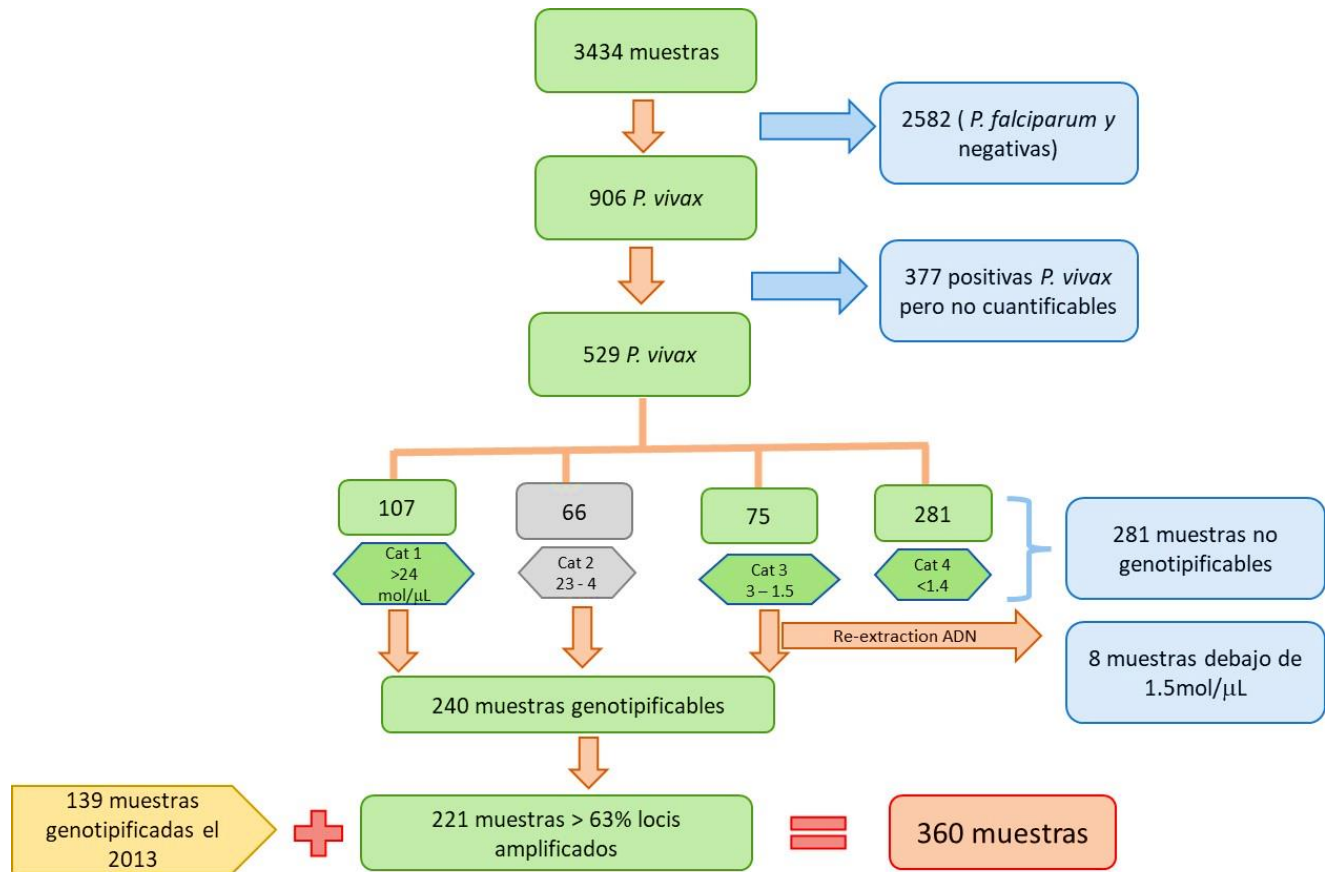
ANEXOS:

ANEXO 1: INFORMACIÓN DE LOS 16 MARCADORES MICROSATÉLITES.

Microsatélite	Cromosoma	Motivo de repetición	Tamaño pb	Th
11.162	11	ATAC	222	60
14.297	14	AAG	200	57
Ch2.121	2	TTA	172	67
Ch2.152	2	AAT	153	63
Ch14.2986	14	AT	175	57
Ch14.3010	14	AT	207	60
Ch14.3021	14	TA	228	57
Ch2.122	2	ATA	197	60
13.239	13	TTTA	210	58
Ch14.2981	14	AT	161	63
MS6	11	(TCC)2(TCT)3(CCT)2(TCC)2GCTTCT(TCC)10	241	57
MS9	8	(GGA)18	188	57
3.502	3	AACGGATG	168	55
MS15	5	(TCT)10	243	57
MS20	10	(GAA)11GAG(GAA)13(CAA)4GAA(CAA)5	211	60
MS4	6	(AGT)18	220	57

Tamaño del microsatélite en pare de bases (pb), Th: temperatura de hibridación, cromosoma: ubicación del microsatélite en el cromosoma.

ANEXO 2: FLUJOGRAMA DE LA SELECCIÓN DE MUESTRAS COLECTADAS DURANTE 2015 Y 2016 EN SANTA EMILIA.



ANEXO 3: PREVALENCIA DE CASOS DE MALARIA Y *P. vivax* DETECTADOS POR MICROSCOPIA EN SANTA EMILIA.

Año	Microscopía				
	n	Malaria	Prevalencia (%) - 95% IC	<i>P. vivax</i>	Prevalencia - 95% IC
2013	325	169	52	139	43
2015	219	78	36	66	30
Total	544	247	45 [41 – 50]	205	38 [34 - 42]

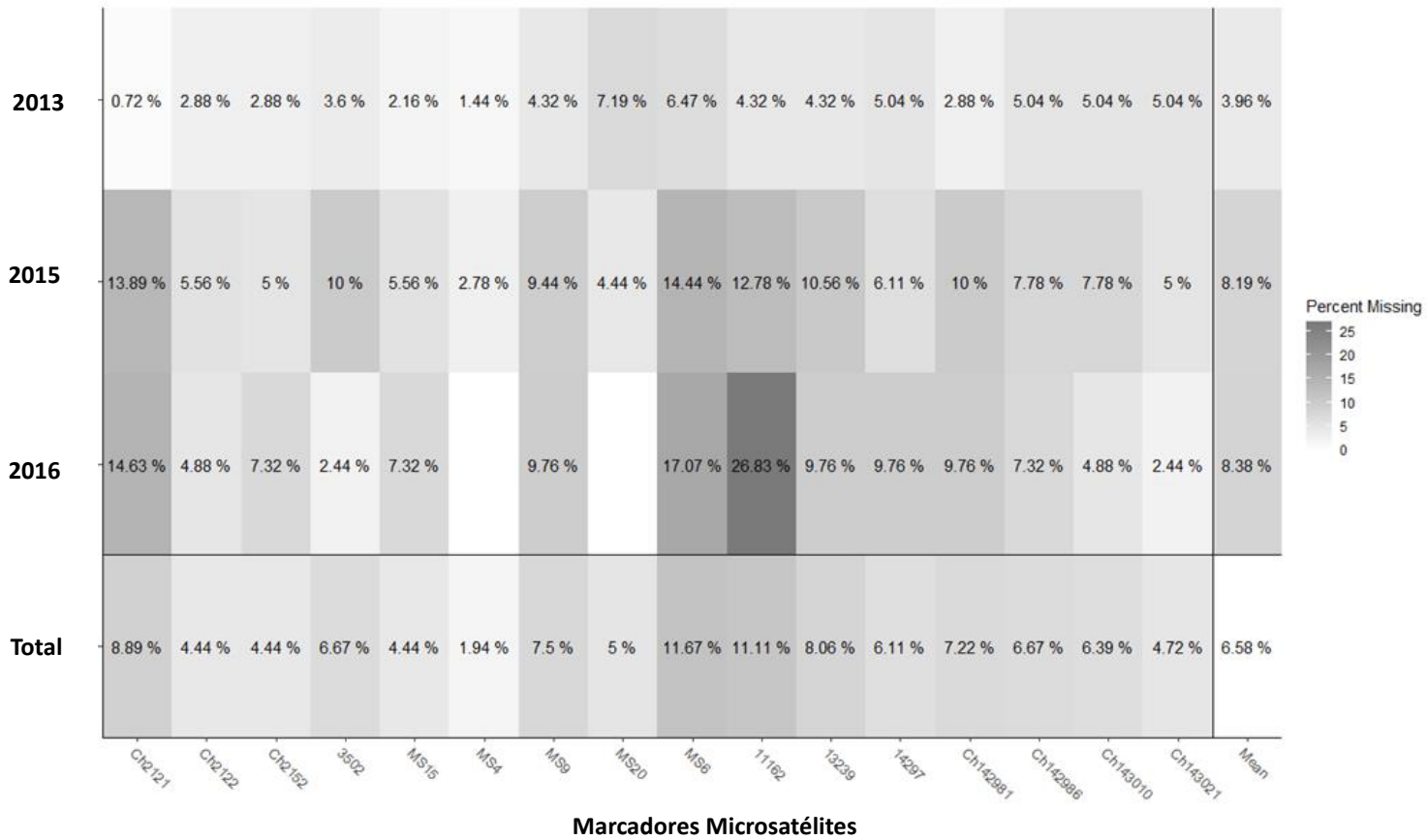
n : Número de muestras, Malaria: Casos detectados por microscopía, 95%IC: Intervalo de confianza en un 95%.

ANEXO 4: PREVALENCIA DE CASOS DE MALARIA, *P. vivax* E INFECCIONES SUBMICROSCÓPICAS DETECTADOS POR PCR EN TIEMPO REAL EN SANTA EMILIA.

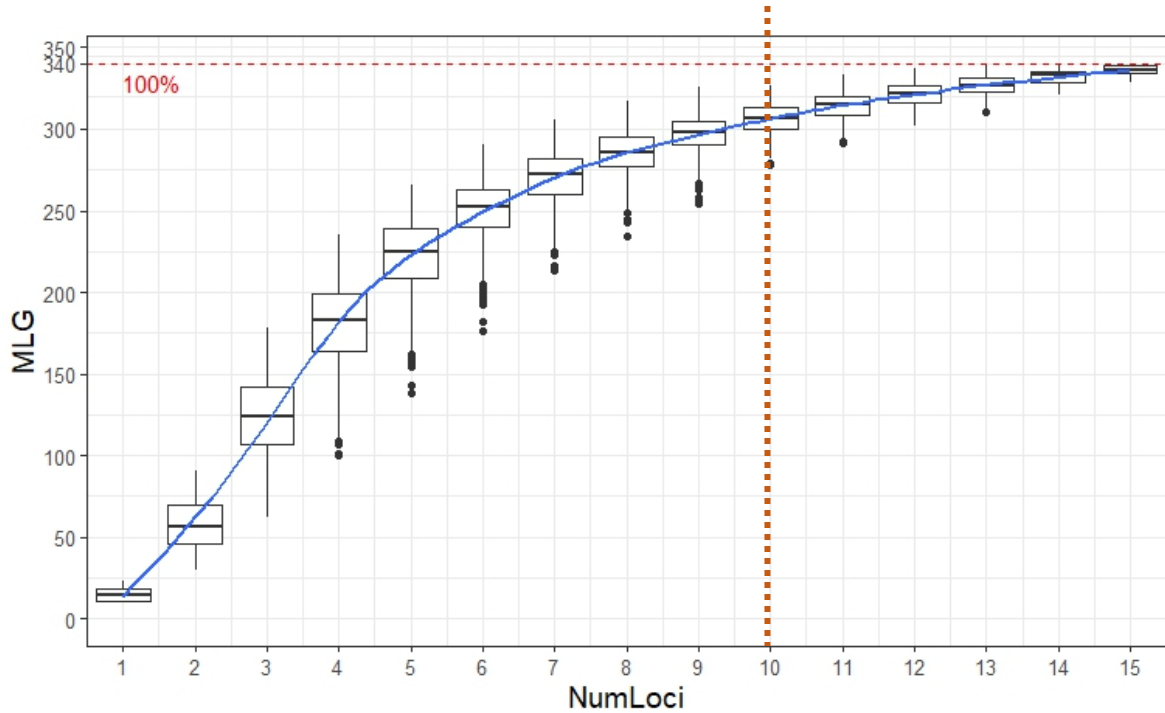
Año	PCR EN TIEMPO REAL					Submicroscópicos <i>P. vivax</i>	Prevalencia Submicroscópicos <i>P. vivax</i> - 95% IC
	n	Malaria	Prevalencia - 95% IC	<i>P. vivax</i>	Prevalencia - 95% IC		
2013	325	258	79	215	66	166	51
2015	219	185	84	122	56	96	44
Total	544	443	81 [0.78 - 0.85]	337	62 [0.58 - 0.67]	262	48 [0.43 - 0.52]

n : Número de muestras, Malaria: Número de casos detectados por microscopía, 95%IC: Intervalo de confianza en un 95%.

ANEXO 5: PORCENTAJE DE INFORMACIÓN PERDIDA POR AÑO DESPUÉS DE LA GENOTIPIFICACIÓN CON 16 MICROSATÉLITES.



ANEXO 6: CURVA DE ACUMULACIÓN DE HAPLOTIPOS DE LAS 360 MUESTRAS DE COLECTADAS EN SANTA EMILIA.



NumLoci: Número de marcadores microsatélites, MLG: Número de genotipos multilocus.

ANEXO 7: PROPORCIÓN DE INFECCIONES POLICLONALES DURANTE LA VIGILANCIA 2013 Y 2015-2016 EN SANTA EMILIA.

Año	Policlonales	Monoclonales	Proporción	Intervalo de confianza al 95%	Grupos de comparación	p-valor
2013	58	81	0.424	[0.332-0.493]	2013-2015	0.6718
2015	69	81	0.460	[0.382-0.539]	2013-2016	1
2016	21	50	0.296	[0.202-0.410]	2015-2016	0.1337
Total	148	212	0.413	-	-	-

Policlonales: Número de infecciones policlonales, Monoclonales: Número de infecciones monoclonales.

ANEXO 8 : VALORES DE LAS MÉTRICAS DE DIVERSIDAD GENÉTICA OBTENIDAS DURANTE LA VIGILANCIA DE CASOS 2013 Y 2015-2016 EN SANTA EMILIA.

Año	N	MLG	Simpson	N.all	Na.e	Hexp	H.sd	H.var.intra	Theta	Theta.sd	rbarD	p.rD
2013	139	113	0.986	5.938	2.470	0.595	0.147	0.001	1.919	0.438	0.181	0.001
2015	150	145	0.993	10.625	2.626	0.619	0.192	0.001	1.623	0.578	0.129	0.001
2016	71	69	0.985	8.188	2.750	0.636	0.187	0.002	1.765	0.711	0.106	0.001
Total	360	319	0.996	13.625	3.417	0.707	0.109	0.000	4.284	1.075	0.118	0.001

N: Número de muestras, MLG: Genotipos multilocus, Simpson: Índice de Simpson, N.all: Número de alelos, Na.e: Número de alelos efectivos, Hexp: Heterocigocidad esperada, H.sd: Desviación estándar de la heterocigocidad, H.var.intra: Varianza intrapoblacional de la heterocigocidad, Theta(θ): Ratio mutacional poblacional, Theta.sd: Desviación estándar de Theta. rbarD: Desequilibrio de ligamiento, p.rD: Significancia estadística del rbarD.

ANEXO 9: TEST DE MONTECARLO, COMPARACIÓN DE LA HETEROCIGOCIDAD ESPERADA (H_e) A TRAVÉS DEL TIEMPO EN SANTA EMILIA.

Montecarlo (colas)	Años de Comparación	p-valor
Izquierda	2013-2015	0.933
	2013-2016	0.053
	2015-2016	0.327
Dos colas	2013-2015	0.065
	2013-2016	0.094
	2015-2016	0.645
Derecha	2013-2015	0.942
	2013-2016	0.955
	2015-2016	0.674

ANEXO 10: PRUEBA ESTADÍSTICA KRUSKALL-WALLY: COMPARACIÓN ENTRE LAS MÉTRICAS DE DIVERSIDAD GENÉTICA DURANTE LA VIGILANCIA DE CASOS 2013 Y 2015-2016 EN SANTA EMILIA.

MÉTRICAS	Años de comparación	dif	chi-cuadrado	p-valor
Alelos efectivos (Na.e)	2013 - 2015 - 2016	2	2	0.3679
RMP (θ)	2013 - 2015 - 2016	2	2	0.3679
D.L	2013 - 2015 - 2016	2	2	0.3679
Índice de Simpson	2013 - 2015 - 2016	2	2	0.3679
MOI	2013 - 2015 - 2016	2	2	0.3679
Alelos totales (N.all)	2013 - 2015 - 2016	2	2	0.3679
MLG	2013 - 2015 - 2016	2	2	0.3679

ANEXO 11: PRUEBA DE CUELLO DE BOTELLA DURANTE LA VIGILANCIA DE CASOS 2013 Y 2015-2016 EN SANTA EMILIA.

Vigilancia	Población	Tamaño de población	Número de alelos	Evento	Test 1 cola		Test 2 colas	
					SMM	TPM	SMM	TPM
Antes	2013	134.15	6	Exceso Het.	0.99957	0.99738	0.00122	0.00671
				Déficit Het,	0.00061	0.00336		
Durante	2015	137.92	10.15	Exceso Het.	1.00000	1.00000	0.00012	0.00012
				Déficit Het,	0.00006	0.00006		
	2016	65.62	8.08	Exceso Het.	0.99994	0.99998	0.00024	0.00037
				Déficit Het,	0.00012	0.00008		

Vigilancia de casos antes y durante el estudio en Santa Emilia. SMM: modelo mutacional de un solo paso, TPM: modelo mutacional de dos fases.

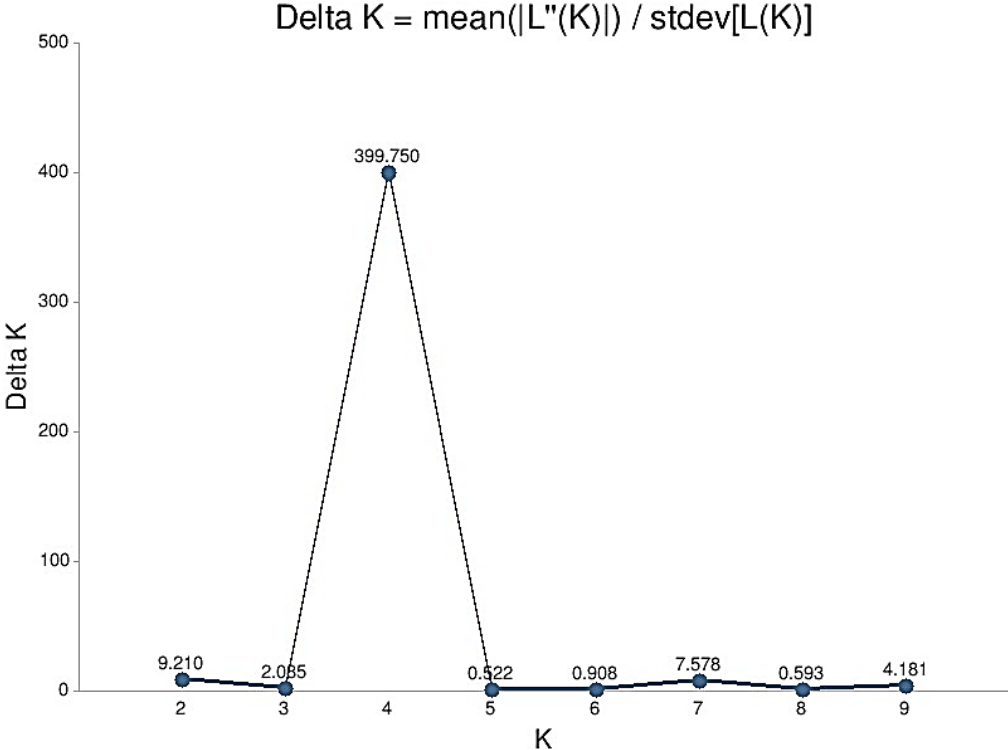
ANEXO 12: ANÁLISIS MOLECULAR DE LA VARIANZA (AMOVA) ENTRE Y DENTRO DE CADA AÑO DE MUESTREO DE *P. vivax* EN SANTA EMILIA.

	Sigma	%
Variación entre años	0.0373	12.955
Variación dentro de cada año	0.2509	87.045
Variación total	0.2883	100.00

ANEXO 13: TEST DE PROPORCIONES ENTRE EL NÚMERO DE PARÁSITOS GENÉTICAMENTE RELACIONADOS 2013 Y 2015-2016.

Proporción de parásitos genéticamente relacionados		Test Exacta de Fisher p-valor	95% IC	Poder estadístico
2013	2015-2016			
135/137	213/223	0.6909	[0.778423 - 1.487854]	0.36

ANEXO 14: POBLACIONES MÁS PROBABLES (DELTA K) DETECTADAS EN SANTA EMILIA.



ANEXO 15: CARACTERÍSTICAS SOCIO-DEMOGRÁFICAS DE LOS PARTICIPANTES DE LA COMUNIDAD DE LIBERTAD Y URCOMIRAÑO.

Variables	Libertad		Urcomiraño		Total	
	n = 358	%	n = 320	%	678	%
Genero						
Varon	192	53.6	176	55.0	368	54.3
Mujer	166	46.4	144	45.0	310	45.7
Edad						
≥15	215	60.1	191	59.7	406	59.9
<15	143	39.9	129	40.3	272	40.1
Nivel de Educación (≥ 3 years) *						
Ninguno	70	19.6	62	19.4	132	19.5
Inicial o Primaria	203	56.7	142	44.4	345	50.9
Secundaria o superior	85	23.7	116	36.3	201	29.6
Principal Ocupación						
Maderero, pescador o agricultor						
no	203	56.7	191	59.7	394	58.1
si	155	43.3	129	40.3	284	41.9
Tiempo en la comunidad (edad>10años)*	n= 117		n=41		n= 158	
<2	54	15.1	8	19.5	62	39.2
2-9.9	32	8.9	12	29.3	44	27.8
>=10	31	8.7	21	51.2	52	32.9
Episodios de malaria en toda su vida*						
0	81	22.6	83	25.9	164	24.2
1	56	15.6	65	20.3	121	17.8
2 to 3	97	27.1	102	31.9	199	29.4
>=4	124	34.6	70	21.9	194	28.6
Uso de mosquiteros (últimas 3 noches)						
si	355	99.2	314	98.1	669	98.7
no	3	0.8	6	1.9	9	1.3
Características de la vivienda						
Material de la pared						
Madera	351	98.0	311	97.2	662	97.6
Ladrillo, cemento y otros	7	2.0	9	2.8	16	2.4
Material del suelo						
Madera	322	89.9	298	93.1	620	91.4
Tierra	36	10.1	22	6.9	58	8.6

*Diferencias estadísticamente significativas entre comunidades.

ANEXO 16: CARACTERÍSTICAS SOCIO-DEMOGRÁFICAS DE LOS VIAJEROS DE LA COMUNIDAD DE LIBERTAD Y URCOMIRAÑO.

Variables	Libertad		Urcomiraño		Total	
	n = 76	%	n = 68	%	n= 144	%
Genero						
Varon	47	61.80	42	61.8	89	60.1
Mujer	29	38.20	26	38.2	55	37.2
Edad						
≥15	58	76.3	51	75	109	73.6
<15	18	23.7	17	25	35	23.6
Nivel de educación (≥ 3 años)*						
Ninguno	7	9.6	3	4.6	10	7.2
Inicial o Primaria	43	58.9	28	43.1	71	51.4
Secundaria o superior	23	31.5	34	52.3	57	41.3
Principal Ocupación *						
Maderero, Pescador o Agricultor						
Si	39	51.3	22	32.4	61	42.4
No	37	48.7	46	67.6	83	57.6
Frecuencia de viaje en el mes						
1	56	73.7	58	85.3	114	79.2
2 to 5	20	26.3	10	14.7	30	20.8
Episodios de malaria en toda su vida						
0	4	5.8	3	5.3	7	5.6
1	19	27.5	16	28.1	35	27.8
2 to 3	15	21.7	21	36.8	36	28.6
>=4	31	44.9	17	29.8	48	38.1
dato perdido	7		11		18	
Horas de viaje*						
<=2	35	46.1	16	23.5	51	35.4
3 a 24	23	30.3	39	57.4	62	43.1
24>	18	23.7	13	19.1	31	21.5
Casos de Malaria	n= 21		n= 4		n=25	
Submicroscópico	17	81.0	4	100.0	21	84.0
Microscópico	4	19.0	0	0.0	4	16.0

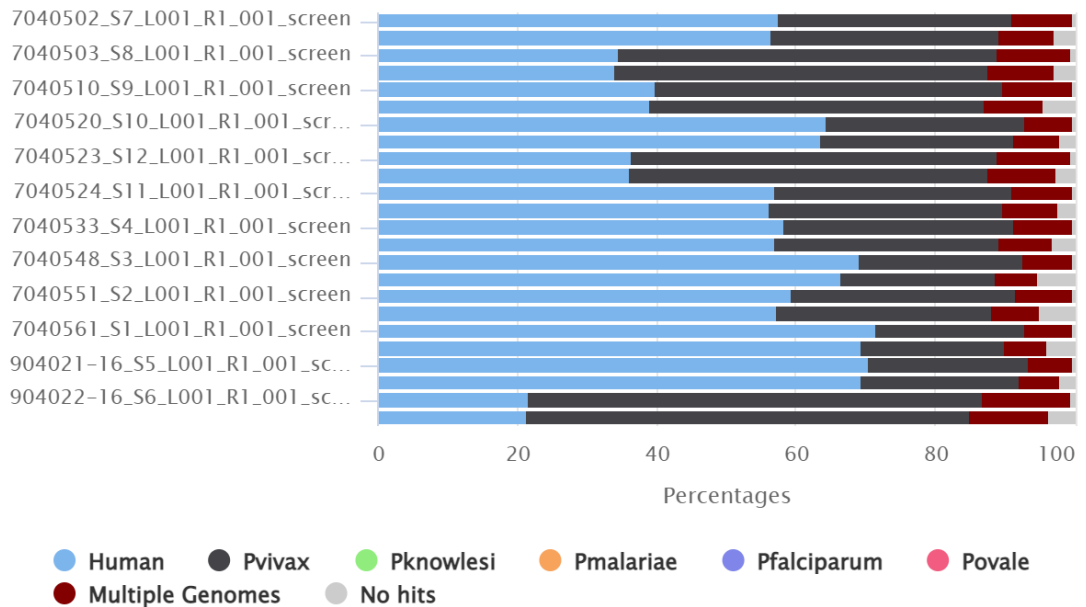
*Diferencias estadísticamente significativas entre comunidades.

ANEXO 17: ÍNDICES DE CONECTIVIDAD EN LA COMUNIDAD DE LIBERTAD Y URCOMIRAÑO.

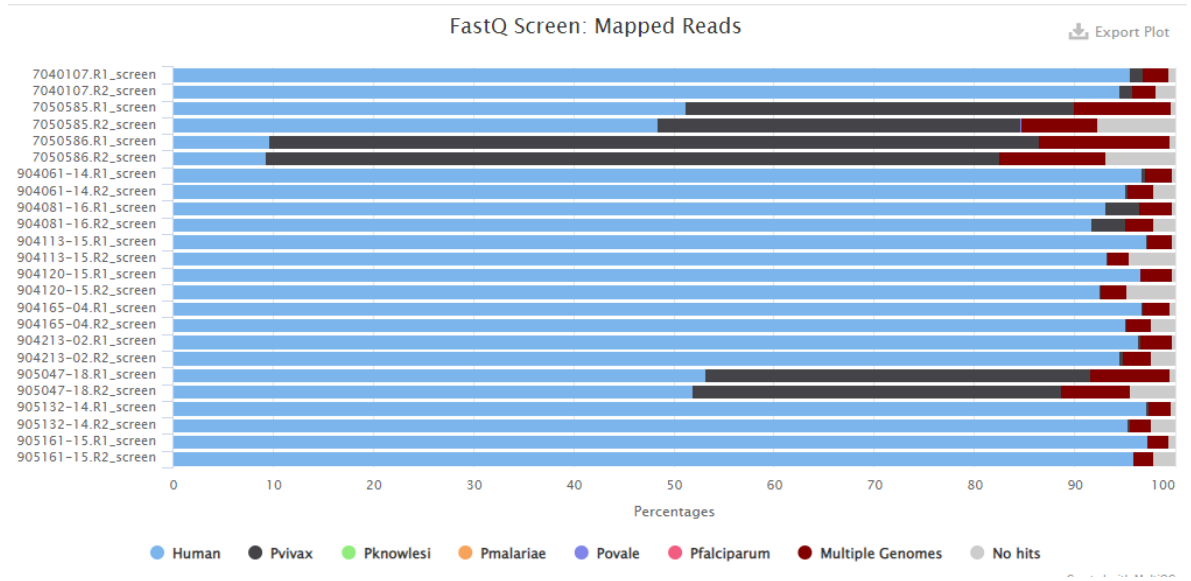
Índices de conectividad		
Lugar	out-degree	in-degree
Libertad	80	18
Urcomiraño	41	26
Mazan	5	42
Iquitos	9	21
Quebrada Arahuana	0	12
Quebrada Armas	0	8

ANEXO 18: ALINEAMIENTO DE LOS *READS* DE LAS MUESTRAS DEL GRUPO 1 CON EL GENOMA HUMANO Y OTRAS ESPECIES DE MALARIA.

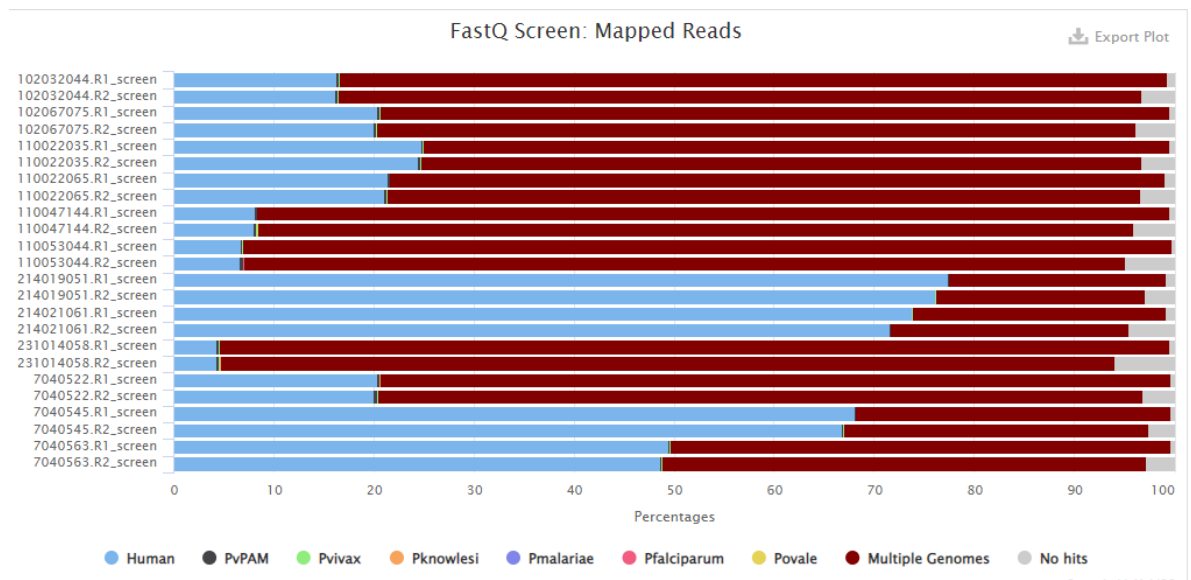
FastQ Screen: Mapped Reads



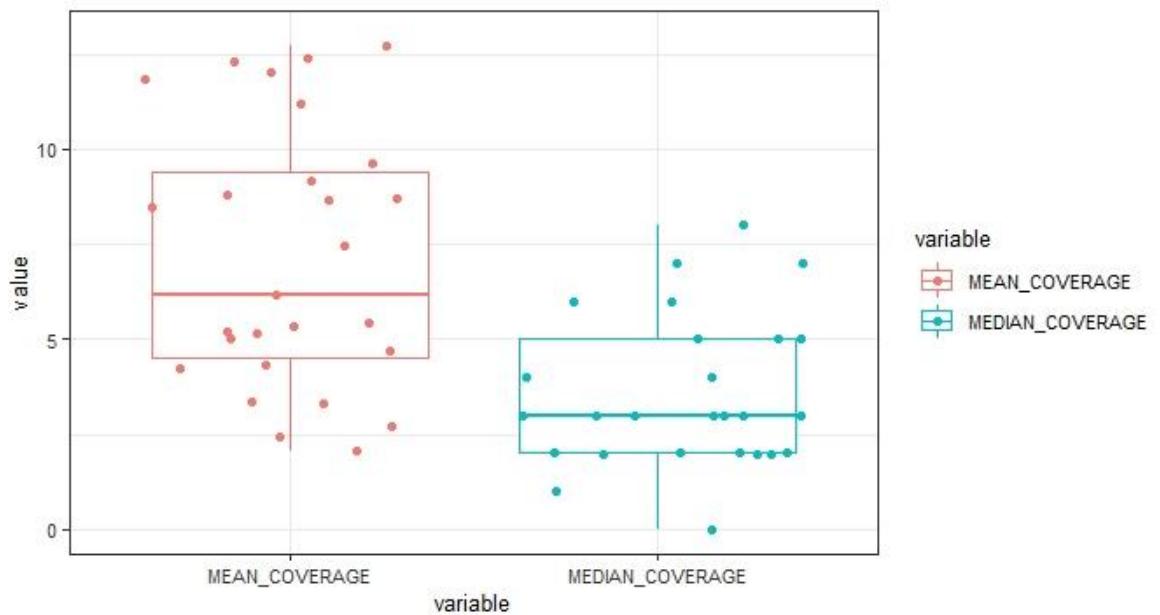
ANEXO 19: ALINEAMIENTO DE LOS *READS* DE MUESTRAS DEL GRUPO 2 CON EL GENOMA HUMANO Y OTRAS ESPECIES DE MALARIA.



ANEXO 20: ALINEAMIENTO DE LOS *READS* DE MUESTRAS DEL GRUPO 3 CON EL GENOMA HUMANO Y OTRAS ESPECIES DE MALARIA.



ANEXO 21: MEDIA Y MEDIANA DE COBERTURA DE LOS *READS* DE LAS 23 MUESTRAS DE *P. vivax* ALINEADOS CON EL GENOMA DE REFERENCIA PvPam.



ANEXO 22: MUESTRAS SECUENCIADAS POR COMUNIDAD Y AÑO DE COLECTA EN LA COMUNIDAD DE LIBERTAD Y URCOMIRAÑO.

Año	Libertad	Urcomiraño	Total
2022	13	3	16
2017	1	0	1
2015	2	4	6
Total	16	7	23

ANEXO 23: MUESTRAS ADICIONALES INCLUIDAS EN EL ANÁLISIS GENÓMICO EN LIBERTAD Y URCOMIRAÑO.

Año de Colecta	Programa de Control y Eliminación	Número de Muestras
2007-2011	PAMAFRO	39
2012-2017	Antes del Plan Malaria Cero.	10
2018-2022	Durante el Plan Malaria Cero.	16
Total		65

ANEXO 24: DIFERENCIACIÓN POBLACIONAL Fst WEIR Y COCHERHAM.

a) Por año de colecta de muestra.



b) Por programa de control y eliminación.

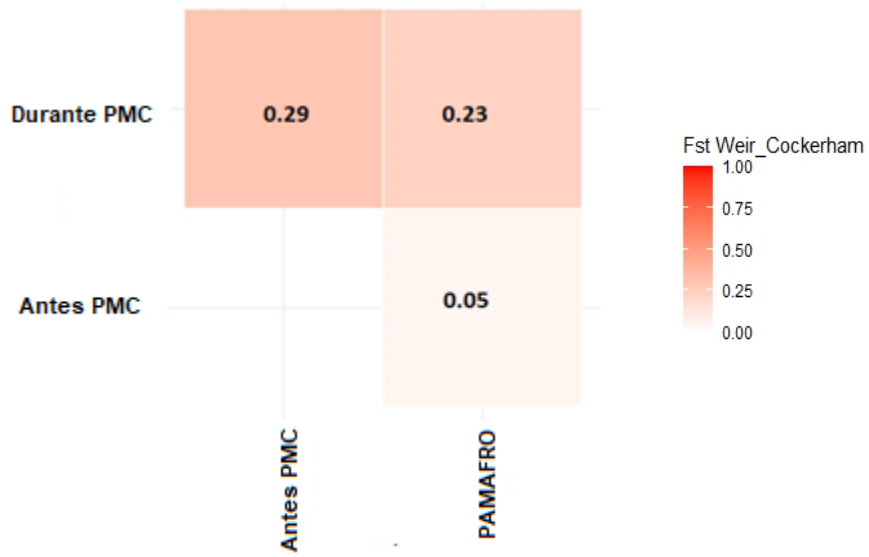
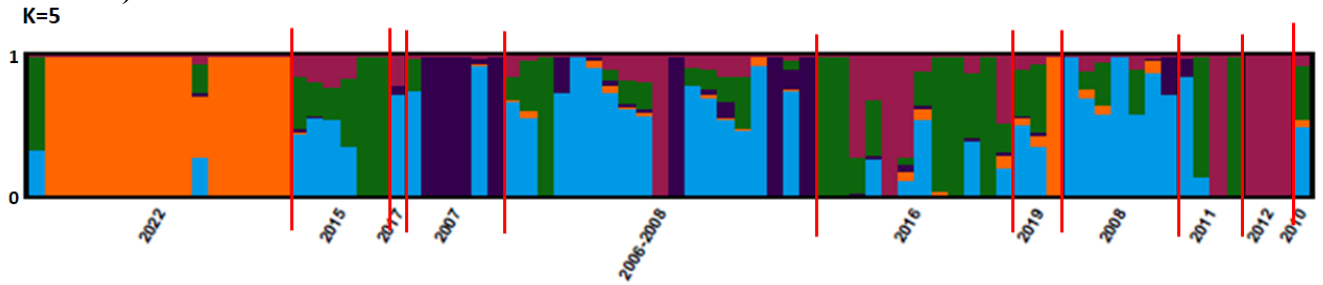


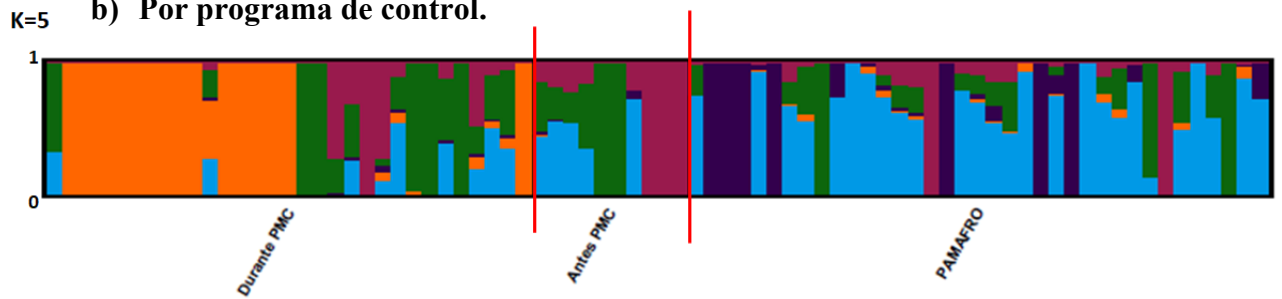
Figura 13: Diferenciación poblacional por comunidad, año de colecta y programa de control y eliminación

ANEXO 25: ESTRUCTURACIÓN POBLACIONAL DE *P. vivax*.

a) Por año de colecta.

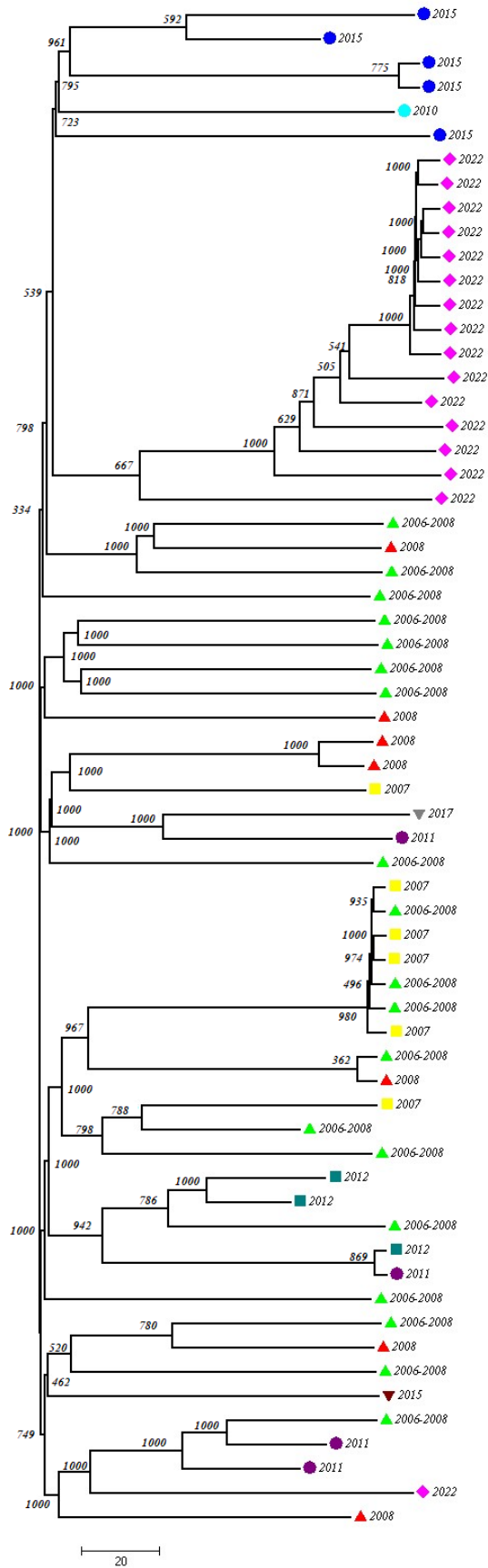


b) Por programa de control.

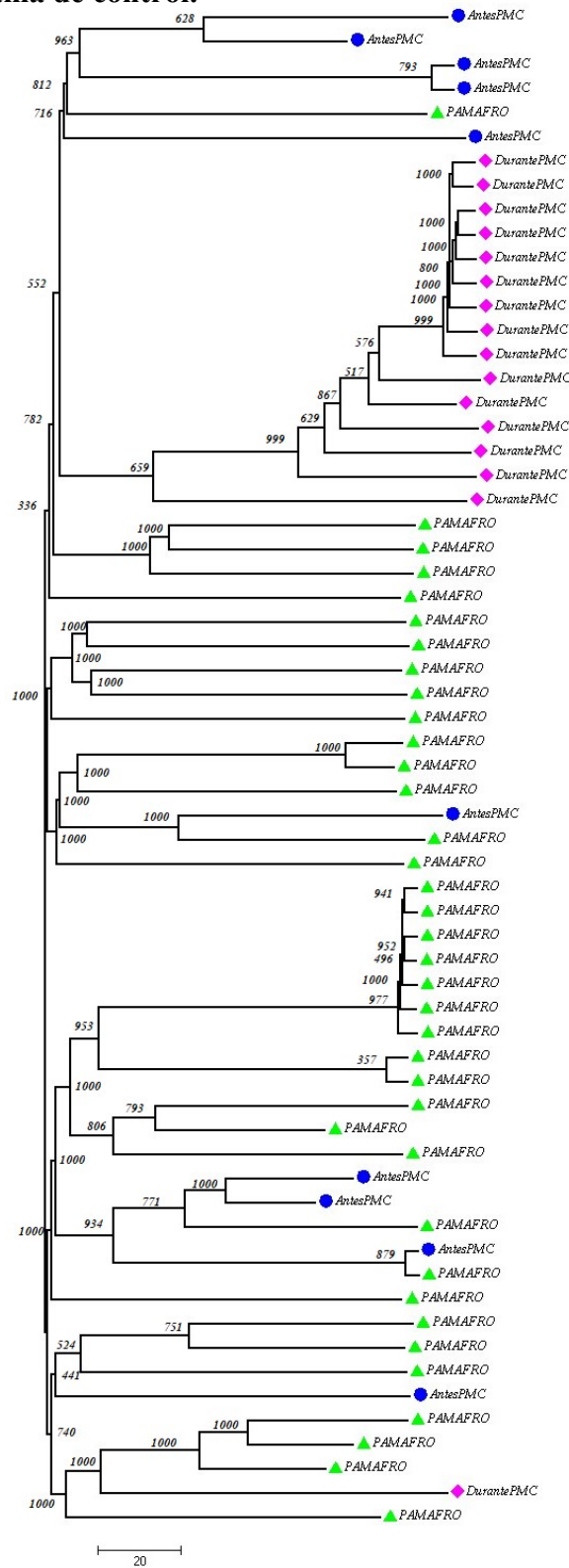


ANEXO 26: ÁRBOL FILOGENÉTICO DE NJ SIN RAÍZ.

a) Por año de colecta.

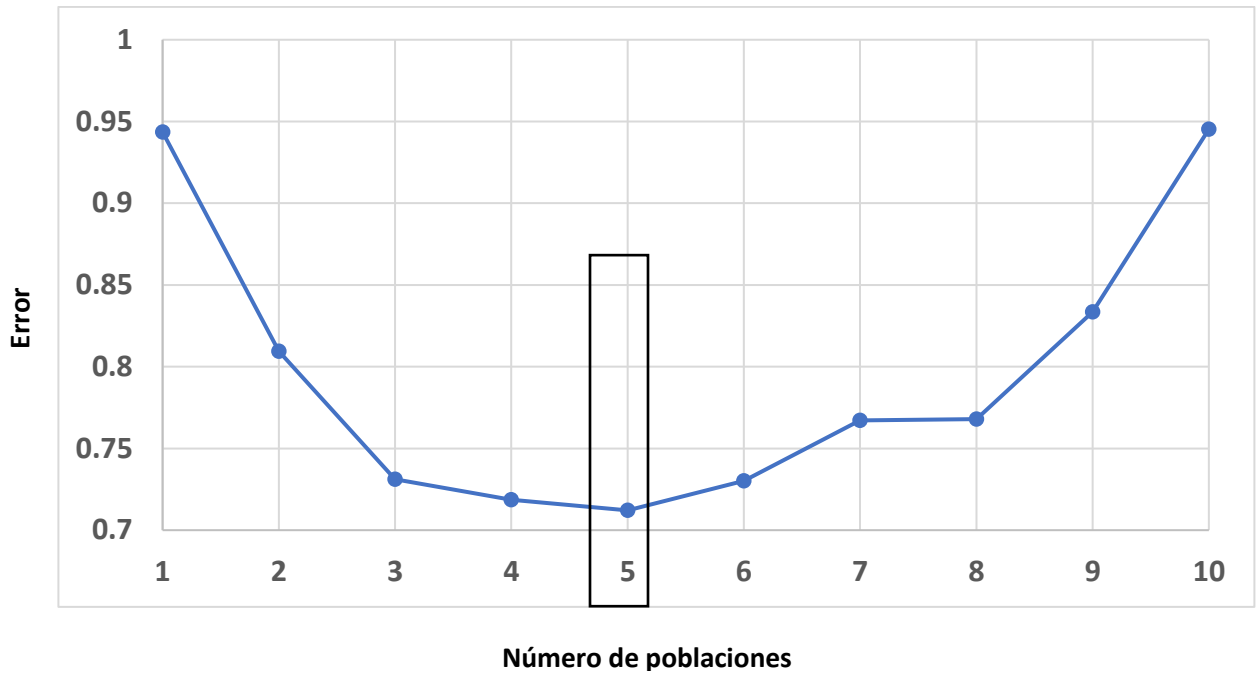


b) Por programa de control.



Árbol filogenético de malaria por año de colecta y programa de control, construido a través del método de Neighbor Joining sin raíz. La distancia entre los taxones fue calculada en base a distancias Euclidianas y el soporte cada nodo se realizó mediante 1000 réplicas de bootstrap. Las longitudes de las ramas indica la distancia genética entre taxones. El árbol se presenta sin raíz lo que implica que los taxones no están orientados evolutivamente.

ANEXO 27: ANÁLISIS CROSS-VALIDATION RESULTADOS OBTENIDOS DEL PROGRAMA ADMIXTURE.



ANEXO 28: PORCENTAJE DE CONTRIBUCIÓN DE CADA POBLACIÓN DE *P. vivax* A LA ESTRUCTURACIÓN POBLACIONAL DE SANTA EMILIA.

Año	Población1_verde	Población2_celeste	Poblacion3_naranja	Poblacion4_morado
2013	30.13	1.42	66.61	1.84
2015	5.79	49.11	5.50	39.61
2016	7.49	50.82	4.42	37.27