



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO VICTOR ALZAMORA CASTRO

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 de Loreto

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

JHONATAN JESÚS ALARCÓN BALDEÓN

LIMA – PERÚ

2016

JURADO EVALUADOR DE LA TESIS

Dr. CÉSAR CÁRCAMO CAVAGNARO (PRESIDENTE)

Dr. VICTOR NEYRA CHAGUA (VOCAL)

Mg. TERESA BARRETO GAVIRIA (SECRETARIA)

ASESOR

Dra. DIONICIA GAMBOA VILELA

CO-ASESOR

Mg. OSCAR NOLASCO CÁRDENAS

DEDICATORIA

A mis padres Jesús Alarcón Gutiérrez y Flor Edith Baldeón Colonio por ser los pilares de mi vida; A mi querida esposa Cecilia Soto Valdez y a mi pequeña hija Danna Sofía por ser mi mayor motivación día tras día.

AGRADECIMIENTOS

A todos los miembros del laboratorio de Malaria de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

A mi asesora Dionicia Gamboa y co-asesor Oscar Nolasco por su tiempo y dedicación.

A Paulo Manrique y Gabriel Carrasco por su constante apoyo en la realización de este trabajo.

A los miembros de mi comité y jurado de tesis por su paciencia y asesoría científica.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

- Los estudios de maestría del Sr. Jhonatan Alarcón, fueron financiados por una beca otorgada por el CONCYTEC (Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica).
- Este trabajo fue financiado principalmente por el CONCYTEC (Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica) de acuerdo al Contrato 014-2013.
- Este trabajo fue financiado también por el Centro de Excelencia de Investigación en Malaria de la Amazonia, U19AI089681 del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABLAS

ABREVIATURAS

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	4
2.1.	Planteamiento del problema	4
III.	MARCO TEÓRICO	6
3.1.	Ciclo de vida de <i>Plasmodium vivax</i>	6
3.2.	Malaria en el Perú	8
3.3.	Diagnóstico de Malaria	8
3.4.	Recurrencia de Malaria por <i>P. vivax</i>	9
3.5.	Carga parasitaria	11
3.6.	Genotipificación por microsatélites	13
3.7.	Multiplicidad de infección (MOI)	14
3.8.	MOI y carga parasitaria	15
3.9.	Análisis de STRUCTURE	17
IV.	JUSTIFICACIÓN	19

V.	HIPOTESIS Y OBJETIVOS	20
5.1.	Hipótesis	20
5.2.	Objetivo general	20
5.3.	Objetivos específicos	20
VI.	METODOLOGÍA	22
6.1.	Diseño del estudio	22
6.2.	Población de estudio, selección y tamaño de muestra	23
6.2.1.	Población de estudio	23
6.2.2.	Tamaño de muestra	25
6.3.	Procedimientos y técnicas	27
6.3.1.	Extracción de ADN	27
6.3.2.	Curvas estándar	28
6.3.3.	qPCR ERV-3	30
6.3.4.	qPCR 18S rRNA	31
6.3.5.	Análisis de datos qPCR	32
6.3.5.1.	Cuantificación ERV-3	32
6.3.5.2.	Cuantificación 18S rRNA	33
6.3.5.3.	Normalización de carga parasitaria	34
6.3.6.	Correlación carga parasitaria en papel filtro y sangre total determinadas por qPCR	34
6.3.7.	Cuantificación del gen ERV-3 y 18S rRNA para determinación de carga parasitaria	36

6.3.8. Amplificación de genoma completo de muestras con baja parasitemia	38
6.3.9. Genotipificación por microsatélites	39
6.3.10. Análisis de electroferogramas	42
6.3.11. Determinación de la MOI	42
6.3.12. Determinación de los tipos de recurrencias por <i>P. vivax</i> mediante el análisis de STRUCTURE en ambas comunidades	43
6.4. Plan de análisis	45
6.4.1. Análisis estadístico	45
6.5. Consideraciones éticas	46
VII. RESULTADOS	48
7.1. Correlación de carga parasitaria en papel filtro y sangre total	48
7.2. Parasitemias recurrentes	49
7.3. Carga parasitaria por qPCR vs Carga parasitaria por gota gruesa	50
7.4. Carga parasitaria en los episodios de recurrencia de los individuos de ambas comunidades	51
7.5. Carga parasitaria vs recurrencia de malaria	54
7.6. MOI en los episodios de recurrencias	55
7.7. MOI y carga parasitaria en los individuos con recurrencia de ambas comunidades	56
7.8. Relación de carga parasitaria y MOI en los individuos con recurrencia de ambas comunidades	57

7.9.	Tipos de recurrencia por <i>P. vivax</i> mediante el análisis de STRUCTURE en ambas comunidades	59
VIII.	DISCUSIÓN	62
IX.	CONCLUSIONES	69
X.	LIMITACIONES DEL ESTUDIO	70
XI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida de *Plasmodium vivax* (pág. 7).

Figura 2: Flujograma de trabajo (pág. 23).

Figura 3: Mapa de las comunidades de San José de Lupuna y Cahuide – Iquitos (pág. 25).

Figura 4: Flujograma correlación de carga parasitaria en sangre total (ST) vs sangre en papel filtro (PF) (pág. 35).

Figura 5: Flujograma de muestras del estudio (pág. 37).

Figura 6: Correlación entre carga parasitaria en papel filtro (PF) y carga parasitaria en sangre total (ST) determinadas por qPCR (pág. 48).

Figura 7: Correlación de carga parasitaria normalizada por qPCR vs la determinada por gota gruesa (GG) (pág. 51).

Figura 8: Carga parasitaria en los episodios de recurrencia de los individuos de las comunidades de Cahuide y Lupuna (pág. 52).

Figura 9: Carga parasitaria en los episodios de recurrencia patentes y subpatentes de los individuos de las comunidades de Cahuide y Lupuna (pág. 53).

Figura 10: Multiplicidad de infección en los episodios de recurrencias de los individuos de ambas comunidades (pág. 55).

Figura 11: MOI y carga parasitaria en los individuos con recurrencias de ambas comunidades (pág. 56).

Figura 12: Estructura poblacional de los episodios de recurrencia de los individuos de Cahuide y Lupuna (pág. 60).

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Lista de marcadores microsatélite seleccionados para el análisis que fueron evaluados en la comunidad de Cahuide (pág 40).

Tabla 2: Comparación carga parasitaria entre episodios de recurrencia de los individuos de Cahuide y Lupuna y en ambas comunidades juntas (pág. 54).

Tabla 3: Modelo univariado GLMM de factores asociados a la parasitemia en individuos con recurrencia por *P. vivax* (pág. 57).

Tabla 4: Modelo multivariado GLMM de factores asociados a la parasitemia en individuos con recurrencia por *P. vivax* (pág 58).

Tabla 5: Tipos de recurrencias en los individuos de las comunidades de Cahuide y Lupuna (pág. 61).

ABREVIATURAS

- **Multiplicidad de infección (MOI)**
- **Modelo lineal generalizado mixto (GLMM)**
- **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**
- **Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo (qPCR)**
- **Proteína de unión a Duffy de *Plasmodium vivax* II (PvDBPII)**
- **Retrovirus endógeno humano - 3 (ERV-3)**
- **Polimorfismo de un solo nucleótido (SNP)**
- **Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)**
- **Polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP)**
- **Buffer Tris-HCl, EDTA, NaCl (TEN)**
- **Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)**
- **Dodecilsulfato sódico (SDS)**
- **Buffer Tris-HCl , EDTA (TE)**
- **Ácido ribonucleico ribosomal (rRNA)**
- **Ácido desoxirribonucleico (DNA)**
- **Desoxinucleótido trifosfato (dNTP)**

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la relación entre carga parasitaria y multiplicidad de infección (MOI) de *P. vivax*, además de determinar el tipo de recurrencia en los individuos de las comunidades de San José de Lupuna y Cahuide. Luego de un seguimiento desde agosto del 2012 a marzo del 2014, se seleccionaron 123 individuos con recurrencias de ambas comunidades y utilizando un modelo lineal generalizado mixto (GLMM) se evaluó en ellos la relación entre carga parasitaria medida por qPCR y la MOI de *P. vivax* determinada mediante la genotipificación de 17 marcadores microsatélites. Adicionalmente se determinaron los tipos de recurrencia en un grupo menor de estos individuos mediante un análisis de STRUCTURE. La relación encontrada entre carga parasitaria y MOI fue inversa ($p < 0.001$). Las parasitemias fueron menores en los episodios de recurrencia pero con resultados no significativos. Además la mayoría de las recurrencias fueron heterólogas, por lo tanto probablemente hayan sido reinfecciones por clonas diferentes, sin embargo no se descarta que también hayan podido ser relapsos heterólogos. Estos resultados nos indican que la MOI de *P. vivax* en los individuos de estas comunidades no influye en la respuesta inmune para controlar las parasitemias en los episodios de recurrencia, aun cuando estas pudieran ser reinfecciones.

PALABRAS CLAVES: *Plasmodium vivax*, carga parasitaria, qPCR, multiplicidad de infección, microsatélites, recurrencia.

ABSTRACT

This study aimed to determine the relationship between parasite load and multiplicity of infection (MOI) of *P. vivax* in addition to determine the type of recurrence in individuals from the communities of San José de Lupuna and Cahuide. After a follow-up from August 2012 to March 2014, 123 individuals were selected with recurrences in both communities. Generalized linear mixed models (GLMM) were used to evaluate the relationship between parasite load measured by qPCR and MOI of *P. vivax* determined by genotyping 17 microsatellite markers among these individuals. Additionally the type of recurrence in a minor group of these individuals was determined by the STRUCTURE analysis. The relationship found between parasite load and MOI was inverse ($p < 0.001$). The parasitemia were lower in episodes of recurrence but with no significant results. In addition most recurrences were heterologous, therefore probably they are the result of reinfection by different clones, however it is also possible that there have been heterologous relapses. These results indicate that the MOI of *P. vivax* in individuals of these communities does not influence the immune response to control parasitemia in episodes of recurrence, even if those correspond to reinfections.

KEY WORDS: *Plasmodium vivax*, parasite load, qPCR, multiplicity of infection, microsatellites, recurrence.

I. INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad causada por parásitos del género *Plasmodium* y transmitida por mosquitos hembras del género *Anopheles*, que representa una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en los países de las regiones tropicales del mundo. Aproximadamente 3,2 mil millones de personas en todo el mundo están en riesgo de contraer malaria. Para el año 2015 hubo un estimado de 214 millones de nuevos casos de malaria, de los cuales 13.8 millones fueron causados por *Plasmodium vivax*. (1).

En el Perú la malaria por *P. vivax* representa alrededor del 80% del total de casos anuales (2). La región de Loreto que concentra la mayoría de los casos, es considerada un área hipo-endémica, donde las infecciones por *P. vivax* son de un particular interés debido a los casos de recurrencia y de baja carga parasitaria (3,4). Esta última podría estar influenciada por la respuesta inmunológica adaptativa de los pacientes, generada por las repetidas infecciones (5).

Las infecciones por *P. vivax* además pueden presentar multiplicidad de infección (MOI), o la presencia de múltiples clones del parásito en un mismo individuo. En países del continente africano y empleando marcadores antigénicos, se ha encontrado que la MOI para *Plasmodium falciparum* varía con la edad, la carga parasitaria, y también con la intensidad de transmisión (6–10). Sin embargo, otros estudios no han encontrado tales relaciones, posiblemente debido a la baja sensibilidad de los métodos utilizados para determinar carga parasitaria y el uso

de marcadores antigénicos para determinar la MOI (11,12), debido a que se encuentran bajo presión de selección principalmente del sistema inmune (13).

Para *P. vivax*, en una población de alta transmisión en Papua Nueva Guinea, se determinó que muestras policlonales presentan mayor carga parasitaria que muestras monoclonales (14). Sin embargo estos resultados, fueron obtenidos utilizando el gen de la proteína de unión a Duffy de *Plasmodium vivax* II (PvDBPII) el cual es un marcador antigénico.

Últimamente para *P. vivax* se han desarrollado estudios que determinan MOI utilizando microsatélites (15,16), eliminando la influencia del uso de marcadores antigénicos por el uso de marcadores neutrales. No obstante la mayoría de estudios utilizando microsatélites se han centrado en la diversidad genética del parásito (17), el monitoreo molecular de ensayos clínicos (18) y en evaluar su participación en relapsos (19,20). Por lo que no hay estudios que relacionen la MOI utilizando marcadores neutrales (microsatélites), con la carga parasitaria de *P. vivax* en individuos con recurrencias, y mucho menos en regiones de baja transmisión como la Amazonía Peruana.

Debido a la presencia de hipnozoítos en las infecciones por *P. vivax*, resulta difícil la determinación de los tipos de recurrencia en individuos de zonas endémicas (19). La característica de los diferentes tipos de recurrencias ha sido muy poco definida en estas regiones de la Amazonia Peruana a pesar de la obvia relevancia para el control y eliminación de la malaria (4).

El presente estudio evaluó la dinámica de las parasitemias recurrentes, a lo largo de un año y medio de seguimiento, determinando la relación y los patrones de variación entre la carga parasitaria y la MOI de *P. vivax*, además se analizaron las recurrencias utilizando el programa STRUCTURE mediante la asignación de *cluster* de los episodios de recurrencia (R1, R2, etc.) comparados con el primer episodio (D0) en los individuos de las comunidades de San José de Lupuna y Cahuide de la región de Loreto.

II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las comunidades de San José de Lupuna y Cahuide que pertenecen a la región amazónica de Loreto, son zonas de baja transmisión de la enfermedad (3). Las actividades desarrolladas por los pobladores de estas comunidades como la agricultura y el comercio, principalmente en Cahuide debido a su cercanía con la carretera; o la caza y la pesca, en el caso de Lupuna por ser una comunidad aislada y rodeada por ríos, ocasiona que los pobladores de ambas comunidades se encuentren expuestos a los vectores de transmisión de malaria incrementando el riesgo de que se infecten y contraigan la enfermedad, que puede manifestarse de una forma aguda sintomática o como una infección asintomática (21).

Estudios en comunidades de la región Loreto han determinado que existe un grupo de pacientes con recurrencias y que muchas de estas son infecciones submicroscópicas (3,22). Sin embargo no es claro aún el potencial de estos pacientes en relación a la transmisión de la enfermedad y su posible participación como reservorios.

En zonas de baja transmisión de malaria muy pocos estudios han determinado la MOI (23). Un mayor número de clones presentes en el paciente aumenta la probabilidad de que algunos parásitos evadan el sistema inmune, si son antigénicamente diferentes, y otros que portan mutaciones, resistan a los

tratamientos como lo reporta Kyabayinze *et al* en un estudio con *P. falciparum* en Uganda (24). Todo esto conduce a que los parásitos persistan en estos pobladores.

La MOI como índice que señala intensidad de transmisión puede darnos información de cómo se ha comportado la misma en estas dos comunidades. Además el determinar la relación entre la MOI y la carga parasitaria en individuos recurrentes nos permitirá comprender la participación de este índice en la parasitemia, la cual es relevante no solo por la infección misma y su relación con la sintomatología, sino porque además forma parte importante en la transmisión de la enfermedad, debido a que se tienen individuos con parasitemias recurrentes que podrían estar participando como reservorios del parásito.

No existen estudios que hayan evaluado la dinámica y la relación de la carga parasitaria y MOI de *P. vivax* en individuos con recurrencias, además de la determinación del tipo de recurrencias en zonas de baja transmisión, como las comunidades de San José de Lupuna y Cahuide. El presente estudio planteó evaluar la dinámica y la relación entre la carga parasitaria y la multiplicidad de infección de *P. vivax* en los individuos con recurrencias de ambas comunidades. Esta información podría darnos indicios importantes para entender la transmisión de la malaria en estas localidades, lo que permitirá tomar mejores medidas para el control de la enfermedad en estas zonas, como la administración adecuada de los tratamientos antimaláricos en vista de la presencia de recurrencias y el papel potencial de estas en la transmisión de la enfermedad.

III. MARCO TEÓRICO

3.1.- CICLO DE VIDA DEL *Plasmodium vivax*

Plasmodium vivax tiene un ciclo de vida que involucra el mosquito *Anopheles* como hospedero definitivo y el humano como hospedero intermediario. El ciclo comienza cuando un humano es picado por la hembra del mosquito *Anopheles*, la cual inocular los esporozoítos al torrente sanguíneo iniciándose la fase asexual del parásito.

En la fase asexual se observan dos estadios; el exoeritrocítico, donde los esporozoítos [1] entran a la circulación sanguínea, infectan los hepatocitos y forman los esquizontes [2], que darán lugar a la formación de merozoítos [3]. Una proporción de los parásitos de la fase hepática de *P. vivax* en lugar de inmediatamente someterse a la replicación asexual pasan por un período de reposo. Estos parásitos latentes son los denominados hipnozoítos [4], los cuales se reactivarán varias semanas, meses o en algunos casos hasta años después de la infección primaria y son los responsables de los relapsos. El estadio exoeritrocítico termina cuando los merozoítos invaden los eritrocitos [5], conocida como fase eritrocítica, dentro de estos los merozoítos maduran formando el trofozoíto joven, el trofozoíto adulto, y seguidamente el esquizonte, que origina nuevamente merozoítos que al romper el eritrocito infectado invaden muchos más eritrocitos iniciando nuevamente esta fase [6]. Luego de 2 ó 3 generaciones, algunos merozoítos se desarrollan en gametocitos [7], los cuales

son transferidos al mosquito durante la picadura a un humano infectado iniciándose la fase sexual del parásito que tiene una duración de una a dos semanas aproximadamente; en esta etapa los gametocitos ingeridos maduran a gametos [8], se fusionan y dan lugar al cigoto [9]. El cigoto se introduce en el epitelio intestinal del vector donde forma un ooquineto y luego un oocisto [10], luego del cual se desarrollan miles de esporozoítos que migran a las glándulas salivales [11], de donde serán inoculadas en una nueva picadura del mosquito al torrente sanguíneo de un nuevo humano iniciando nuevamente el ciclo del parásito (Figura 1) (25).

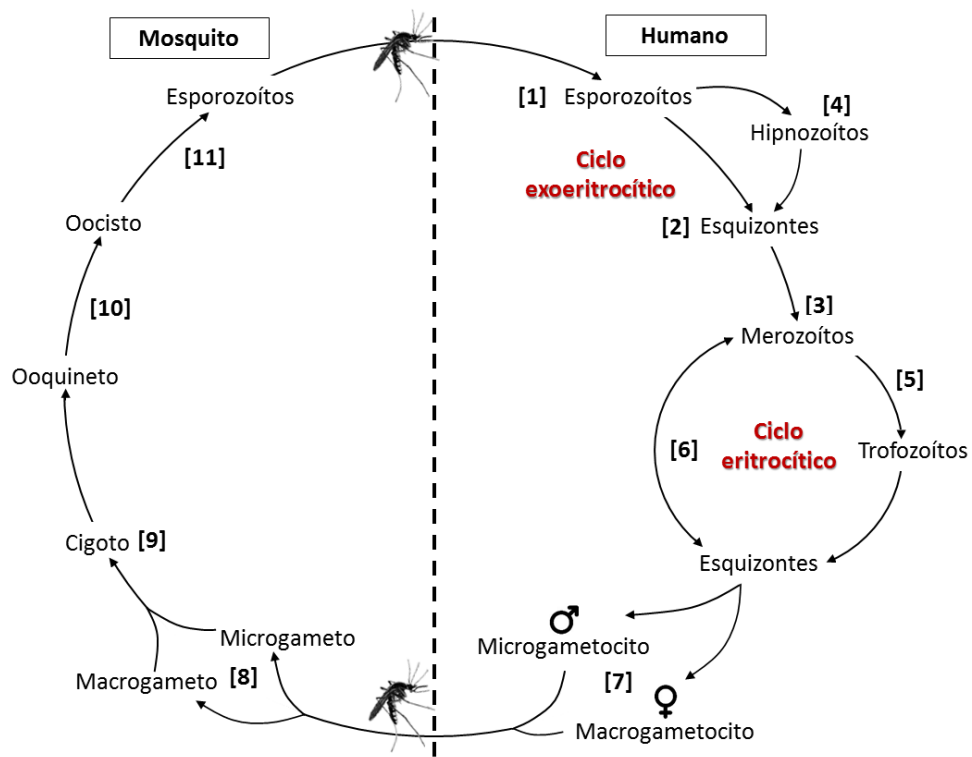


Figura 1. Ciclo de vida de *Plasmodium vivax*.

3.2.- MALARIA EN EL PERÚ

En el Perú la malaria es endémica y estacional. El área de transmisión involucra escenarios epidemiológicos como la cuenca amazónica, valles occidentales de la costa norte y valles interandinos (2). La mayor incidencia de malaria en el Perú se da en el departamento de Loreto ubicado en el norte de la región amazónica.

En el 2015 la región Loreto registró el 95.39% de los casos notificados, seguido por los departamentos de Junín, Amazonas y San Martín, que constituyen un segundo estrato en relación a los casos de enfermedad. En ese año a nivel nacional se notificaron 62220 casos, de los cuales 59349 procedieron de Loreto y 46924 fueron casos confirmados de *P. vivax* (2).

3.3.- DIAGNÓSTICO DE MALARIA

La diferenciación de las especies de *Plasmodium* es esencial para la selección del tratamiento apropiado. A pesar de que las últimas normas incluyen nuevos métodos para diagnóstico de malaria, el método de rutina y el más usado sigue siendo el examen microscópico de gota gruesa y frotis sanguíneo teñido con Giemsa (26–28), el cual es la prueba “*gold standard*” (prueba de oro) para el diagnóstico de malaria. Sin embargo ya es conocido que este método presenta baja sensibilidad, debido a que requiere una adecuada interpretación por parte del observador. Incluso se ha demostrado que con microscopistas experimentados, se

puede producir un diagnóstico erróneo, en particular en casos de infección mixta o de baja parasitemia (26,29).

El diagnóstico molecular de *Plasmodium* usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha resultado tener una mayor sensibilidad y discriminación de especies en comparación con el diagnóstico microscópico o el inmunocromatográfico (30,31). La necesidad de un método más sensible, eficiente y de menor tiempo llevó al desarrollo de ensayos moleculares que involucraban PCR en tiempo real (32,33). El PCR en tiempo real tiene además el potencial de detectar bajos niveles de parasitemia de hasta 0.5 - 1 parásito/ μ L en muestras de sangre total y en papel filtro (34,35), además de cuantificar la parasitemia y permitir la diferenciación de especies (35).

3.4.- RECURRENCIA DE MALARIA POR PLASMODIUM VIVAX

Las recurrencias de malaria por *P. vivax* son debidas a relapsos, reinfecciones y recrudescencias (4). Cuando una parasitemia reaparece después de un episodio inicial, esta puede tratarse de un relapso, por una reactivación de estadios latentes del parásito que se encuentran en el hígado (hipnozoítos); una reinfección, por la picadura infectante de otro mosquito; o una recrudescencia, por la presencia de estadios asexuales sanguíneos del parásito que sobreviven a la terapia si esta fue administrada y permanecen en niveles subpatentes dentro del hospedero (36).

Debido a la capacidad de *P. vivax* de ocasionar relapsos y a la posibilidad de que se den las reinfecciones, es complicado el manejo y control de la malaria por *P. vivax*. Los relapsos presentan variaciones notables de acuerdo a las diferentes regiones geográficas y climáticas, las cepas de regiones tropicales se caracterizan por una infección primaria temprana, seguida por una latencia de 3 a 5 semanas, antes de la aparición del relapso. Al contrario las cepas de regiones templadas presentan un largo periodo latente, de 8 a 10 meses, antes del comienzo de los relapsos (37,38).

La recrudescencia es la parasitemia recurrente post tratamiento debido a resistencia a los fármacos por parte del parásito. El tratamiento recomendado por el Ministerio de Salud para una cura radical involucra: la combinación de Cloroquina (CQ) y Primaquina (PQ) durante 7 días (39). La primera elimina trofozoítos y esquizontes que son las formas asexuales responsables de las manifestaciones clínicas, y la segunda elimina los hipnozoítos en el hígado, para prevenir los relapsos.

Es difícil la distinción de los tipos de parasitemias recurrentes. Dentro de las causas se encuentra el desconocimiento del perfil genético del hipnozoíto presente en el hígado y la falta de datos de transmisión exactos, sumado a la posibilidad de que se den reinfecciones durante dos episodios de recurrencia (40).

3.5.- CARGA PARASITARIA

La carga parasitaria o el número de parásitos circulantes en una infección por *P. vivax* está relacionada a muchos factores como la inmunidad (41), el tratamiento (42) las tasas de reinfección (19), y la multiplicidad de infección (43) .

En la cuantificación de *P. falciparum* por *nested* qPCR se pueden tener muestras con parasitemias de pacientes sintomáticos y asintomáticos que correlacionan con las parasitemias determinadas por microscopia, así como un gran grupo de pacientes asintomáticos con microscopia negativa pero con cargas parasitarias variables determinadas por *nested* qPCR (34). Lo mismo puede ocurrir cuando se cuantifica *P. vivax* por qPCR, lo que evidencia su importancia en la determinación de altas y bajas parasitemias, cuando no pueden ser detectadas por microscopia en pacientes sintomáticos o asintomáticos (44).

En regiones de baja transmisión de malaria, como la Amazonía Peruana, los casos de infecciones por *P. vivax* son principalmente de baja carga parasitaria (3), que pueden deberse entre otras causas a la respuesta inmunológica por parte del hospedero (5).

Estas infecciones submicroscópicas solo causan enfermedad aguda de manera ocasional (45), pero existe evidencia de que serían suficientes para infectar a los mosquitos y contribuir con la transmisión de la enfermedad (46). Cuantificar la extensión de estas infecciones submicroscópicas y por consiguiente determinar la

verdadera prevalencia de parásitos en diferentes entornos, resulta fundamental para comprender la dinámica de transmisión de la malaria (42,44).

La qPCR ha permitido la cuantificación de las infecciones con cargas parasitarias sustancialmente inferiores a las medidas por microscopía (47). La sensibilidad de estas pruebas, es decir, la probabilidad de que se detecte al menos 1 glóbulo rojo infectado, está directamente relacionado con el volumen de sangre que puede evaluar la prueba así como con la densidad de parásitos presentes en la muestra(48). Se ha demostrado que la qPCR utilizando ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico obtenido a partir de muestras sanguíneas en papel filtro puede determinar cargas parasitarias de 4-40 parásitos/ μ L que representa una sensibilidad mayor a la obtenida por gota gruesa cuyo límite de detección es de alrededor de 40 parásitos/ μ L (34,49).

Determinar la carga parasitaria utilizando muestras en papel filtro representa un método rápido y simple, que necesita poca muestra sanguínea la cual puede ser obtenida por punción digital. El uso del papel filtro es una importante alternativa porque permite recolectar la muestra, secarla sobre papel de filtro y almacenarla de una manera adecuada. Adicionalmente los costos de almacenamiento y transporte son bajos, lo cual es muy útil cuando se realizan grandes estudios de campo para el control de la malaria (34,50).

Sin embargo, la cuantificación absoluta de la carga parasitaria a partir de muestras de sangre en papel de filtro es difícil, ya que por lo general no se

conoce el volumen sanguíneo de cada muestra, y la eficiencia de la extracción de ADN y amplificación del gen “blanco” difiere entre los tipos de papel (50). Adicionalmente para disminuir estas diferencias entre individuos y tener resultados comparables con la mayoría de estudios, es necesario el uso de un normalizador. Uno de los utilizados es el recuento del gen ERV-3 (retrovirus endógeno humano 3) para determinar el número de células nucleadas en una muestra. Esto ha permitido determinar la carga parasitaria de *Leishmania*, reportando el número de parásitos por número de células nucleadas cuantificadas mediante ERV-3 en el mismo volumen de muestra. (51,52).

3.6.- GENOTIPIFICACIÓN POR MICROSATÉLITES

Los microsatélites son marcadores moleculares de uno a seis nucleótidos que se repiten en tándem, que se encuentran con frecuencia en todo el genoma y son típicamente neutrales, es decir no se encuentran bajo presión de selección. Los microsatélites han sido de gran utilidad para el estudio de la genética de poblaciones de varios organismos, incluyendo *P. vivax* (19,53–55). Varios microsatélites polimórficos han sido utilizados para caracterizar las poblaciones de *P. vivax* en países del Sudeste Asiático, Sudamérica y la región Amazónica Peruana (22,56,57).

Anteriormente, la genotipificación de *P. vivax* se realizaba por PCR-RFLP o mediante la secuenciación de genes polimórficos. Los más comúnmente

utilizados eran marcadores antigénicos como los genes que codificaban proteínas de superficie de merozoíto (MSP), proteínas de circumsporozoíto (CSP), antígenos de gametocitos (GAM-1), proteínas de unión al grupo sanguíneo Duffy (DBP) y en los últimos años se han empezado a utilizar los microsatélites y polimorfismos de nucleótido único (SNPs) (58,59).

La detección de tamaño de polimorfismos mediante electroforesis capilar en combinación con software de análisis tales como GeneMapper o GeneMarker demostraron ser una herramienta valiosa para genotipificación de alta resolución de *P. falciparum* (60). De la misma manera también se utilizó este método para determinar los tamaños de microsatélites de *P. vivax*, lo que ha permitido caracterizar su diversidad genética y estructura poblacional en diferentes áreas endémicas (19,54,61,62).

3.7.- MULTIPLICIDAD DE INFECCIÓN (MOI)

Una infección se define como policlonal si hay al menos un locus con más de un alelo dentro de un solo episodio de malaria. El indicador de la multiplicidad de infección (MOI) es el número mínimo de clones del parásito presentes en la muestra, que es determinado por el locus con el mayor número de alelos (20). Actualmente, las regiones del genoma que contienen secuencias repetitivas polimórficas, tales como los microsatélites, son los marcadores de elección.

El tipo y número de marcadores dependen del propósito del estudio y a menudo la elección se basa en la diversidad de los loci (18,63). Utilizar todos los marcadores disponibles es poco práctico, lleva mucho tiempo, y es costoso para los estudios a gran escala. Lo que se aplica es un enfoque por etapas, utilizando en primera instancia un panel mayor de microsatélites para caracterizar a la población y luego seleccionar el número mínimo de estos marcadores que nos permita describir debidamente a la población de la misma manera que cuando se utilizan todos los marcadores (36).

En contraste con los estudios de genética de poblaciones, donde se analizan un gran número de marcadores neutrales de moderada a alta diversidad, en los estudios epidemiológicos se necesita un número pequeño de marcadores altamente polimórficos para el seguimiento de las infecciones policlonales. Esto se debe principalmente a dos razones: la primera es que cuando las infecciones policlonales se definen como la construcción común de haplotipos, combinar los datos de varios marcadores amplificados por PCR es difícil. La segunda es que cuando MOI se define como el número máximo de clones para cualquiera de los marcadores utilizados, el riesgo de sobreestimar MOI debido a los artefactos de la PCR aumenta con el número de marcadores analizados. Para la amplificación de microsatélites esto se debe a los artefactos de PCR causados por el deslizamiento de la polimerasa (64).

3.8.- MULTIPLICIDAD DE INFECCIÓN (MOI) Y CARGA PARASITARIA

Diversos estudios han determinado la MOI para *P. falciparum* en regiones del continente africano, y algunos en la Amazonía Peruana, pero en su mayoría han utilizado marcadores genéticos antigénicos (9,65,66). Estos estudios principalmente en *P. falciparum* han demostrado que la MOI varía con la edad, la carga parasitaria (6,7,10), y también con la intensidad de transmisión (8,67); sin embargo otros estudios no han encontrado estas relaciones (11,12).

En los últimos años se han empezado a utilizar microsatélites en la determinación de MOI para *P. falciparum* pero principalmente para estudios de diversidad genética (68,69). Para el caso de *P. vivax* un estudio en Papua Nueva Guinea en el 2007 determinó la relación entre la carga parasitaria y la presencia de múltiples clonas del parásito utilizando el gen de la proteína de unión al grupo sanguíneo Duffy (PvDBPII), y se observó que muestras policlonales tenían el doble de carga parasitaria que muestras monoclonales pero fueron resultados estadísticamente no significativos; sin embargo, este es un marcador antigénico y la población pertenece a una región de alta transmisión (14).

Últimamente para *P. vivax* también se han realizado estudios que determinan MOI utilizando microsatélites (15,23,57). Esto supone una diferencia debido a que son marcadores que no están bajo presión de selección, como los antigénicos, sin embargo estos estudios solo se han delimitado a determinar la

diversidad genética del parásito (17), a monitorear molecularmente ensayos clínicos (18), a determinar episodios de relapsos (19,20) y ver su relación con la severidad de la enfermedad (23). Pero no existen estudios que han relacionado la MOI de *P. vivax* con la carga parasitaria en individuos con recurrencia de zonas endémicas de la Amazonia Peruana.

3.9.- ANÁLISIS DE STRUCTURE

El programa STRUCTURE v.2.3.4 es un software libre que usa datos de genotipificación multilocus. El programa tiene diversos usos entre los cuales está inferir la presencia de distintas poblaciones (*Clusters*), asignar individuos a las poblaciones y estimar las frecuencias alélicas de la población en situaciones en las que muchas personas son migrantes o de origen mixto. El análisis de STRUCTURE se puede aplicar a la mayoría de los marcadores genéticos utilizados comúnmente, incluyendo SNPs, microsatélites, RFLPs y AFLP (70).

Para la determinación de estructura poblacional el programa aplica un enfoque de agrupamiento basado en un modelo Bayesiano, este algoritmo identifica genéticamente poblaciones distintas sobre la bases de sus frecuencias alélicas. El programa asume un modelo en el que hay K poblaciones (donde K es desconocido), y donde cada una de estas se caracteriza por un set de frecuencias alélicas para cada locus. El método asigna los individuos a las poblaciones en base a sus genotipos, al mismo tiempo que estima las frecuencias alélicas de las

poblaciones. Múltiples estudios han utilizado STRUCTURE para determinar la estructura poblacional de *P. falciparum* y *P. vivax* en el continente Africano (71), Asia (72,73), Latinoamérica (71) y el Perú específicamente en la Amazonia Peruana (22,74).

IV. JUSTIFICACIÓN

La malaria por *Plasmodium vivax* es endémica en la región de Loreto, y a pesar de las medidas de control que redujeron el número de casos desde hace más de una década, en los últimos años la enfermedad está nuevamente resurgiendo, con un aumento anual en el número de casos desde el 2012. En ese año hubieron 27702 casos, en el 2013 fueron 40917, en el 2014 se tuvieron 54823 y en el 2015 hubo una ligera disminución teniéndose 49745 casos de malaria por *P. vivax* (2). Sin embargo este continuo aumento de la incidencia se desconoce si es por la forma de transmisión de la malaria en esta región o algún otro factor. La recurrencia de las parasitemias podría estar influenciando la transmisión de la malaria posiblemente por la generación de reservorios del parásito. En este estudio se pretende determinar la dinámica y la relación de la carga parasitaria y MOI de *P. vivax* en individuos con recurrencia de las comunidades de Cahuide y Lupuna. La información obtenida nos permitirá conocer la variación de las parasitemias en las recurrencias de estos individuos, además de cuál es el comportamiento de la MOI de *P. vivax* en las mismas. La información obtenida podría permitirnos establecer mejores medidas de control, como la disminución de recurrencias en estas localidades y la erradicación de la malaria por *P. vivax*, que en última instancia permitirá una mejora en el bienestar de los pobladores de las regiones endémicas de la Amazonía Peruana.

V. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

5.1.- HIPÓTESIS

Existe una relación directa entre la carga parasitaria y la multiplicidad de infección de *Plasmodium vivax* en los individuos con recurrencias de las comunidades de San José de Lupuna y Cahuide de la región de Loreto.

5.2.- OBJETIVO GENERAL

Determinar la relación y los patrones de variación de la carga parasitaria y la multiplicidad de infección de *P. vivax* en individuos con recurrencias.

5.3.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar un método para determinación de carga parasitaria de *P. vivax* en muestras de sangre en papel filtro.
- Determinar la carga parasitaria de *P. vivax* en los individuos con recurrencias de las comunidades de San José de Lupuna y Cahuide de la región de Loreto.
- Determinar la multiplicidad de infección de *P. vivax* en los individuos con recurrencias de las comunidades de San José de Lupuna y Cahuide de la región de Loreto.

- Determinar los tipos de recurrencia por *P. vivax* mediante la comparación de *clusters* determinados utilizando los datos del análisis de STRUCTURE en los individuos de las comunidades de San José de Lupuna y Cahuide.

VI. METODOLOGÍA

6.1.- DISEÑO DEL ESTUDIO

El presente es un estudio de tipo observacional, descriptivo, retrospectivo y longitudinal donde se seleccionaron muestras sanguíneas en papel filtro de pacientes de las comunidades de San José de Lupuna y Cahuide, que fueron captados por detección activa, durante un año y medio de seguimiento de agosto del 2012 a marzo del 2014. A estos pacientes se les tomó una muestra sanguínea por punción digital mensualmente para la realización del diagnóstico de malaria por microscopía (gota gruesa y frotis). Al mismo tiempo se recolectó sangre en papel filtro para la confirmación del diagnóstico por PCR en tiempo real, llevado a cabo en los laboratorios de Iquitos. Las determinaciones por qPCR sin embargo se realizaron trimestralmente durante el año y medio de seguimiento.

Se definió la recurrencia por *P. vivax* como cualquier infección sanguínea (sintomática o asintomática) identificada por qPCR, después de 7 días posterior a una detección inicial previa. Dentro de todas las muestras recolectadas y con diagnósticos positivos para malaria, se identificaron pacientes que presentaron 2 o más muestras con parasitemia detectable por qPCR. A las muestras sanguíneas en papel filtro de estos individuos se les determinó la carga parasitaria por qPCR y la multiplicidad de infección en la primera muestra así como en las respectivas muestras de recurrencia que tuvieron cada uno de los pacientes. Con estos datos se determinó la relación de la carga parasitaria y la MOI (Figura 2).

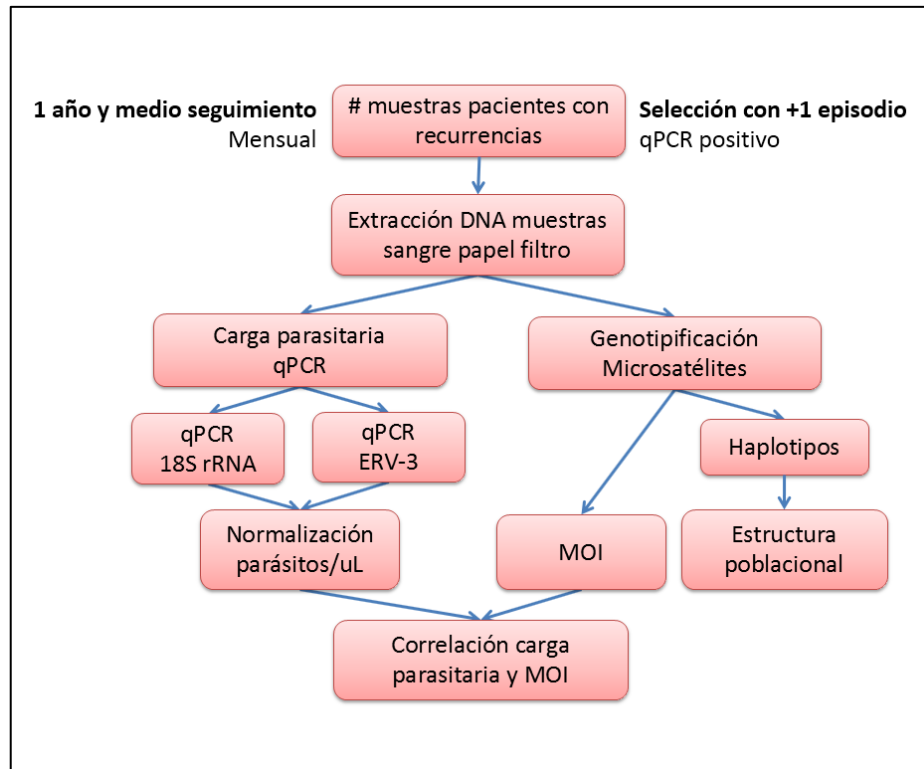


Figura 2. Flujograma de trabajo

6.2.- POBLACIÓN DE ESTUDIO, SELECCIÓN Y TAMAÑO DE MUESTRA

6.2.1.- POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de estudio comprendió dos comunidades, situadas alrededor de la ciudad de Iquitos. La primera, San José de Lupuna, es una comunidad perteneciente al distrito de Iquitos, localizada a orillas del río Nanay por lo cual solo es accesible por bote. Este pueblo se encuentra en una región densamente boscosa con muchos ríos y pantanos, que son escenarios que favorecen el

crecimiento de *Anopheles darlingi*, el vector de la malaria en esta región (21). Esta comunidad presenta un clima tropical, y una transmisión de malaria constante con un incremento durante la estación lluviosa, de noviembre a mayo. Los pobladores realizan actividades para subsistir como la agricultura, la caza esporádica y la pesca (Figura 3) (22).

La otra comunidad, Cahuide, es un poblado perteneciente al distrito de San Juan, situado a lo largo de la carretera de Iquitos-Nauta a 60 Km de la ciudad de Iquitos. Este pueblo se encuentra a orillas del río Itaya, un afluente del río Amazonas, que presenta también un hábitat adecuado para el crecimiento de *Anopheles darlingi*. Esta área presenta alta incidencia de malaria, y una transmisión continua con aumento de casos en temporadas de lluvias (75). Las actividades de subsistencia de los pobladores de esta localidad incluyen la agricultura (76), la pesca, el comercio y la producción de carbón en pequeña escala (Figura 3).

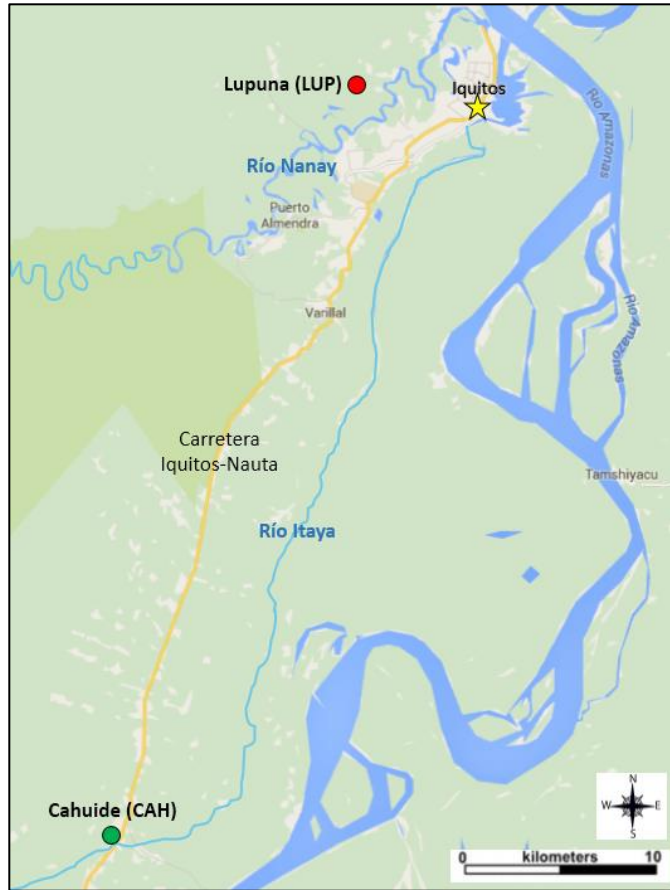


Figura 3. Mapa de las comunidades de San José de Lupuna y Cahuide – Iquitos.

Imagen tomada y modificada de Google maps (77).

6.2.2.- TAMAÑO DE MUESTRA

Se realizó un muestreo propositivo para abarcar de forma exhaustiva la totalidad de individuos con episodios recurrentes en el proyecto (“Impacto de los portadores asintomáticos en la epidemiología y control de la malaria en la Amazonía Peruana”, Código SIDISI: 57395). Debido al tipo de recolección de

datos de este trabajo el tamaño muestral no fue calculado, sin embargo se determinó el poder estadístico mediante el método de *bootstrap*, simulando una población de 1000000 personas con una distribución de Poisson similar a la parasitemia observada en el estudio. En base a esta población se hizo un remuestreo con 1000 iteraciones y se calculó el poder como el porcentaje de veces que las diferencias observadas son mayores a las que serían causadas solo por azar.

Los individuos que fueron incluidos para el estudio son los pobladores con parasitemias recurrentes para *P. vivax* de ambas comunidades, captados en el seguimiento por un año y medio que cumplieron con los siguientes criterios de selección.

Los criterios de inclusión fueron:

- Individuos residentes en las zonas de estudio comprendidos entre 3 a 86 años de edad, que hayan firmado el consentimiento informado y en el caso de menores de edad cuyos padres hayan firmado el asentimiento informado.
- Individuos con resultados positivos para dos o más muestras secuenciales determinadas por qPCR para *P. vivax* y evaluados durante el año y medio de seguimiento.
- Individuos con muestra suficiente para el análisis
- Individuos con ficha de datos completa

Los criterios de exclusión fueron:

- Individuos con qPCR negativo para *P. vivax* o que presentaron coinfección con *P. falciparum*.
- Individuos con muestras que fueron insuficientes para el análisis.
- Individuos con ficha de datos incompleta
- Individuos que no hayan firmado consentimiento o asentimiento informado.

6.3.- PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS

6.3.1.- EXTRACCIÓN DE ADN

Para la extracción de ADN de las muestras se utilizó el método de Fenol/Cloroformo. Se extrajo ADN de aproximadamente 4 mm² de papel filtro con sangre seca. El procedimiento de extracción utilizado fue el siguiente: Se agregaron 250 µL de *buffer* TEN 2X (0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 1 M NaCl), 50 µL de SDS (Dodecilsulfato sódico) al 10%, 20 µL de Proteinasa K (Qiagen) y 180 µL de H₂O PCR a un tubo de 1.5 mL conteniendo el papel filtro con sangre. Seguidamente se mezcló en un vortex e incubó a 56°C por 1 hora con agitación constante. Posterior a la incubación se agregó 500 µL de la mezcla Fenol/Cloroformo/Alcohol isoamílico (25:24:1) (Sigma), se agitó vigorosamente y se centrifugó por 5 minutos a 13000 x g. Se retiró la fase acuosa y se pasó a un nuevo tubo. A continuación se agregó 500 µL de

Cloroformo/Alcohol isoamílico (24:1), se mezcló nuevamente en un vortex, se centrifugó por 5 minutos a 13000 x g y se retiró la fase acuosa a un nuevo tubo al que se agregó 1 volumen de etanol absoluto, 0.2 volúmenes de acetato de sodio 3M (pH 5.2) y se incubó por 16 horas en oscuridad a 4°C. Terminada la incubación, se centrifugaron los tubos a máxima velocidad (18000 x g) por 15 minutos; se descartó el sobrenadante por inversión y se dejó secar por 2 minutos en papel toalla, luego se agregó 1 mL de etanol al 70%, se mezcló levemente y se centrifugó a máxima velocidad por 15 minutos. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se dejó secar a 65°C hasta que se evapore el etanol completamente por alrededor de 5 minutos. Finalmente se resuspendió el ADN en *buffer* TE (10 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA pH 8.0) en un volumen de 50 µL.

6.3.2.- CURVAS ESTÁNDAR

Para la determinación de la carga parasitaria se necesitó de una curva estándar de *P. vivax* y una curva estándar de gen ERV-3; ambas se realizaron a partir de diluciones seriadas (1/10) de ADN plasmídico purificado que contenía una sola copia del gen ARN ribosomal 18S de *P. vivax* cepa sal-1 (78) y de un segundo plásmido que contenía una copia del gen ERV-3. Para esto ambos genes insertados en los plásmidos pGEM-T easy vector fueron clonados y luego purificados con el GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific).

Luego se determinó la concentración de los plásmidos por fluorometría en el equipo Qubit™ fluorometer (Invitrogen), y la cantidad de copias del plásmido por microlitro se determinó utilizando la siguiente fórmula:

$$\# \text{ moléculas ADN plásmido}/\mu\text{L} = \frac{Xg/\mu\text{L ADN}}{\# \text{ pb del plásmido} \times 660} / 6.022 \times 10^{23} *$$

* Número de Avogadro

Seguidamente para ambos plásmidos se realizaron diluciones seriadas (1/10) del ADN plasmídico hasta generar concentraciones de 2×10^6 copias/ μL hasta 2×10^{-2} copias/ μL diluido en *buffer* TE (34,52,78) . Como estrategia de confirmación del número real de copias de cada uno de los genes cuantificados en las diluciones de cada plásmido, se realizó una distribución de Poisson de la dilución que contenía 10 copias de cada uno de los plásmidos, confirmándose que en realidad el número de copias de esa dilución corresponde a 4 copias para el plásmido de ERV-3 y a 2.04 copias para el plásmido 18S rRNA. Con esto el número de copias de cada dilución se ajustó teniéndose 4×10^5 copias/reacción hasta 4 copias/reacción para la curva estándar de ERV-3 y 2.04×10^5 copias/reacción hasta 2.04 copias/reacción para la curva estándar de 18S rRNA. Con las curvas estándar ajustadas, se procedió a la determinación del número de copias del gen 18S rRNA y gen ERV-3 en las muestras que formaron parte del estudio.

6.3.3.- qPCR ERV-3

Para cuantificar el número de copias del gen ERV-3 se realizó una PCR en tiempo real utilizando el siguiente set de *primers*, *Forward* PHP10-F (5'-CATGGGAAGCAAGGGAACTAATG-3') y *Reverse* PHP10-R (5'-CCCAGCGAGCAATACAGAATTT-3') previamente reportados (51). La mezcla de reacción de 25 µL utilizó 5 µL de muestra de ADN, 12.5 µL de PerfeCTa® SYBR® Green Fastmix (Quanta Biosciences) y 0.2 uM de cada primer. La reacción se llevó a cabo en el equipo CFX Connect Real Time PCR detection system (Biorad). Las condiciones de PCR consistieron de una desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 minutos, seguido de 45 ciclos de amplificaciones a 95 °C por 20s, 61.5 °C por 30s y a 72 °C por 20s, y una extensión final a 72°C por 3 minutos, con medición de fluorescencia al final de cada etapa de extensión.

Después de la amplificación, se realizó una curva de *melting* (denaturación) para comprobar la especificidad del amplicón, esta consistió de un ciclo a 95 °C por 10s, seguido por 68 °C durante 2 minutos, y un aumento gradual de temperatura de 0.5 °C/s hasta 90 °C, con medición de fluorescencia en cada transición de la temperatura. Cada corrida incluyó un control positivo (ADN de humano), un control negativo (ADN plasmídico *P. vivax*), y un blanco (Agua PCR).

6.3.4.- qPCR 18S rRNA

La detección y cuantificación del ADN de *P. vivax* se realizó mediante PCR en tiempo real utilizando como blanco el gen 18S rRNA, y el siguiente set de *primers*, *Forward* PL1473F18 [5'-TAACGAACGAGATCTTAA-3'] y *Reverse* PL1679R18 [5'-GTTCTCTAAGAAGCTTT-3']) (35). La mezcla de reacción de 25 µL utilizó 5 µL de muestra de ADN, 12.5 µL de PerfeCTa SYBR® Green Fastmix (Quanta Biosciences), y 0.3 µM de cada primer. La reacción se llevó a cabo en el equipo CFX Connect Real Time PCR detection system (Biorad). Las condiciones de PCR consistieron en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 minutos, seguido de 45 ciclos de amplificaciones a 95 °C por 20s, 52 °C por 20s y a 68 °C por 30s, y una extensión final a 68°C por 3 minutos, con medición de fluorescencia al final de cada etapa de extensión. Después de la amplificación de PCR, se realizó una curva de *melting* para comprobar la especificidad del amplicón, esta consistió de un ciclo a 95 °C por 10s, seguido por 68 °C durante 2 minutos, y un aumento gradual de temperatura de 0.5 °C/s hasta 90 °C, con medición de fluorescencia en cada transición de la temperatura. Los datos de fluorescencia se analizaron en el software del equipo, y se consideró una temperatura de *melting* de 77°C para definir las muestras positivas a *P. vivax*. Cada corrida incluyó un control positivo (muestra ADN de *P. vivax*), un control negativo (ADN de humano no infectado), y un blanco (Agua PCR).

6.3.5.- ANÁLISIS DE DATOS qPCR

Se utilizó el software del equipo CFX Connect Real Time PCR detection system (Biorad) para evaluar las curvas de amplificación, de *melting*, y para determinar los valores de Ct (Ciclo umbral). El número de copias del gen ERV-3 y el número de copias del gen 18S rRNA de *P. vivax* se determinaron utilizando los valores de Ct, que con ayuda de la ecuación de la recta de la curva estándar nos permitió determinar el número de copias del ADN blanco por reacción. Se determinó utilizando la siguiente formula:

$$Q = 10^{\frac{(Ct-b)}{a}}$$

Donde “Q” es el número de moléculas de ADN expresado en moléculas por volumen de reacción. El valor de 10 es el factor de dilución usado para realizar la curva estándar. El Ct es el ciclo de amplificación de la muestra otorgado por el software del equipo. El valor de b es el intercepto en el eje “y” de la curva estándar. El valor de “a” es la tangente de la pendiente de la curva estándar.

6.3.5.1.- CUANTIFICACIÓN ERV-3

El número de copias del gen ERV-3 en las muestras se determinó utilizando la formula anteriormente mencionada. Sin embargo el valor determinado representaba el total de copias del gen cuantificado en el volumen de reacción; pero tomando en cuenta que es un gen unicopia y que el humano es diploide,

para determinar el número de copias reales del gen que representa el número de leucocitos se realizó la siguiente formula:

$$\text{Número de leucocitos}/\mu\text{L} = \frac{\text{Número de copias ERV} - 3}{2 \times 5}$$

Donde el valor de 10 es el factor de normalización determinado por la cantidad de microlitros (5 μL), de muestra usada en el ensayo y el número 2, que representa que el organismo es diploide.

6.3.5.2.- CUANTIFICACIÓN 18S rRNA

El número de copias del gen 18S rRNA de *P. vivax* en las muestras se determinó utilizando la formula anteriormente mencionada. Sin embargo este número de la misma manera solo representaba la cantidad de copias del gen 18S rRNA de *P. vivax* en el volumen de reacción; pero teniendo en cuenta que por parásito se presentan 5 copias del gen, para determinar la cantidad real de copias del gen y por ende la cantidad de parásitos, se utilizó la siguiente formula:

$$\text{Número de parásitos}/\mu\text{L} = \frac{\text{Número de copias 18S rRNA}}{5 \times 5}$$

El valor de 25 es el factor de normalización determinado por la cantidad de microlitros de muestra usada en el ensayo (5 μL), y el número de copias del gen por cada genoma del parásito que son 5.

6.3.5.3.- NORMALIZACIÓN DE CARGA PARASITARIA

Finalmente para la determinación de la carga parasitaria de *P. vivax*/ μL de sangre, se tomó en cuenta el número de leucocitos/ μL determinados anteriormente, así como el número de parásitos/ μL , los cuales se utilizaron de esta manera en la siguiente formula:

$$\text{Carga parasitaria}/\mu\text{L} = \frac{\text{Número de parásitos}/\mu\text{L}}{\text{Número de leucocitos}/\mu\text{L}} \times 8.10^3 *$$

* 8000 leucocitos (79,80).

6.3.6.- CORRELACIÓN CARGA PARASITARIA EN PAPEL FILTRO Y SANGRE TOTAL DETERMINADAS POR qPCR

Se evaluó la correlación de la carga parasitaria normalizada por recuento de leucocitos determinada por qPCR en muestras de sangre en papel filtro versus las determinadas en sangre total. La correlación se llevó a cabo para una cantidad de 42 muestras, que fueron obtenidas al triplicar 14 muestras. Todas las muestras

fueron previamente diagnosticadas por microscopía como positivas para *P. vivax*. Un volumen de 20 μ L de cada una de las 42 muestras de sangre se dispensó en papel filtro y se dejó secar. Con esto se tuvieron las 42 muestras de sangre total iniciales y 42 muestras de sangre en papel filtro, a todas estas se les extrajo ADN por el método de Fenol/Cloroformo (Figura 4).

Luego se determinó en cada una de estas muestras el recuento del gen 18S rRNA y el recuento del gen ERV-3 mediante qPCR, posteriormente se determinó la carga parasitaria normalizada antes mencionada. Una vez determinada la carga parasitaria en cada una de las muestras; se evaluó si los recuentos en sangre total correlacionaban cuando se realizaban a partir de sangre en papel filtro.

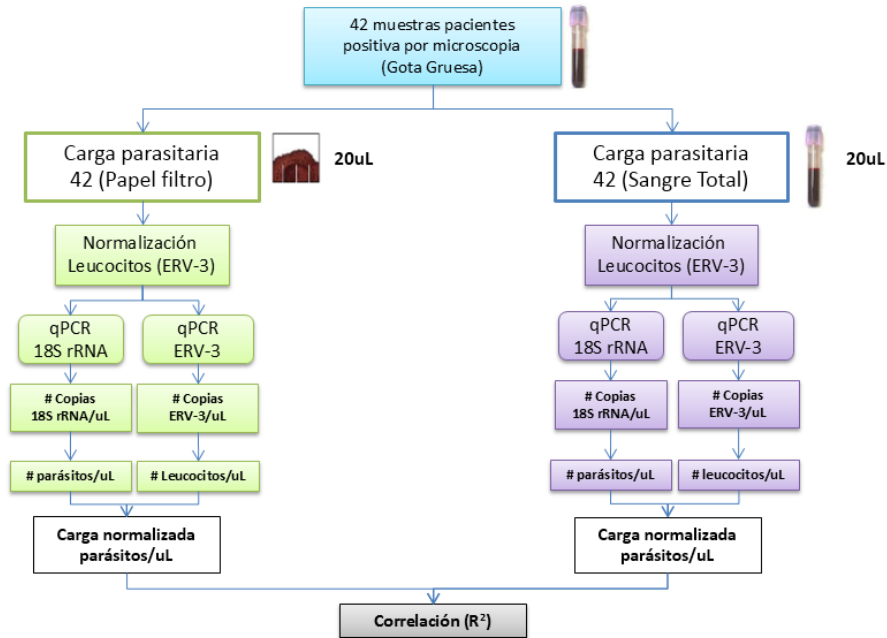


Figura 4. Flujoograma correlación de carga parasitaria en sangre total (ST) vs sangre en papel filtro (PF).

6.3.7.- CUANTIFICACIÓN DEL GEN ERV-3 Y 18S rRNA PARA DETERMINACIÓN DE CARGA PARASITARIA

Se seleccionaron para el proceso de extracción 131 muestras de la comunidad de Cahuide y 145 muestras de la comunidad de San José de Lupuna que corresponden a 123 individuos con recurrencias luego del seguimiento y cuyas parasitemias tuvieron Ct menores de 33.5. Las muestras que tuvieron resultados de qPCR con Ct mayor a 33.5 no se tomaron en cuenta debido a que no iban a poder reamplificarse y por lo tanto no se les iba a poder genotipificar ni determinar la MOI. De estas muestras fueron extraídas realmente 109 de Cahuide y 145 de San José de Lupuna (Figura 5). Se extrajo el ADN por el método de Fenol /Cloroformo, y luego se procedió a determinar la carga parasitaria *de P. vivax*, para lo cual se realizaron qPCR de 18S rRNA y ERV-3 en cada una de las muestras. Con los resultados de Ct se calculó la carga parasitaria utilizando la formula antes mencionada.

Con estos resultados se procedió a seleccionar cuales eran las muestras que pasarían directamente al análisis de los microsatélites y cuales necesitarían de amplificación de genoma completo con el kit Illustra GenomiPhi V2 (GE Healthcare Life Sciences), que fueron las muestras que tuvieron bajas parasitemias. Después de determinar la multiplicidad de infección se tuvo que seleccionar cuales eran los individuos que tuvieron resultados para carga parasitaria, MOI y que además tuvieran episodios de recurrencias para poder describir la dinámica en estas dos comunidades.

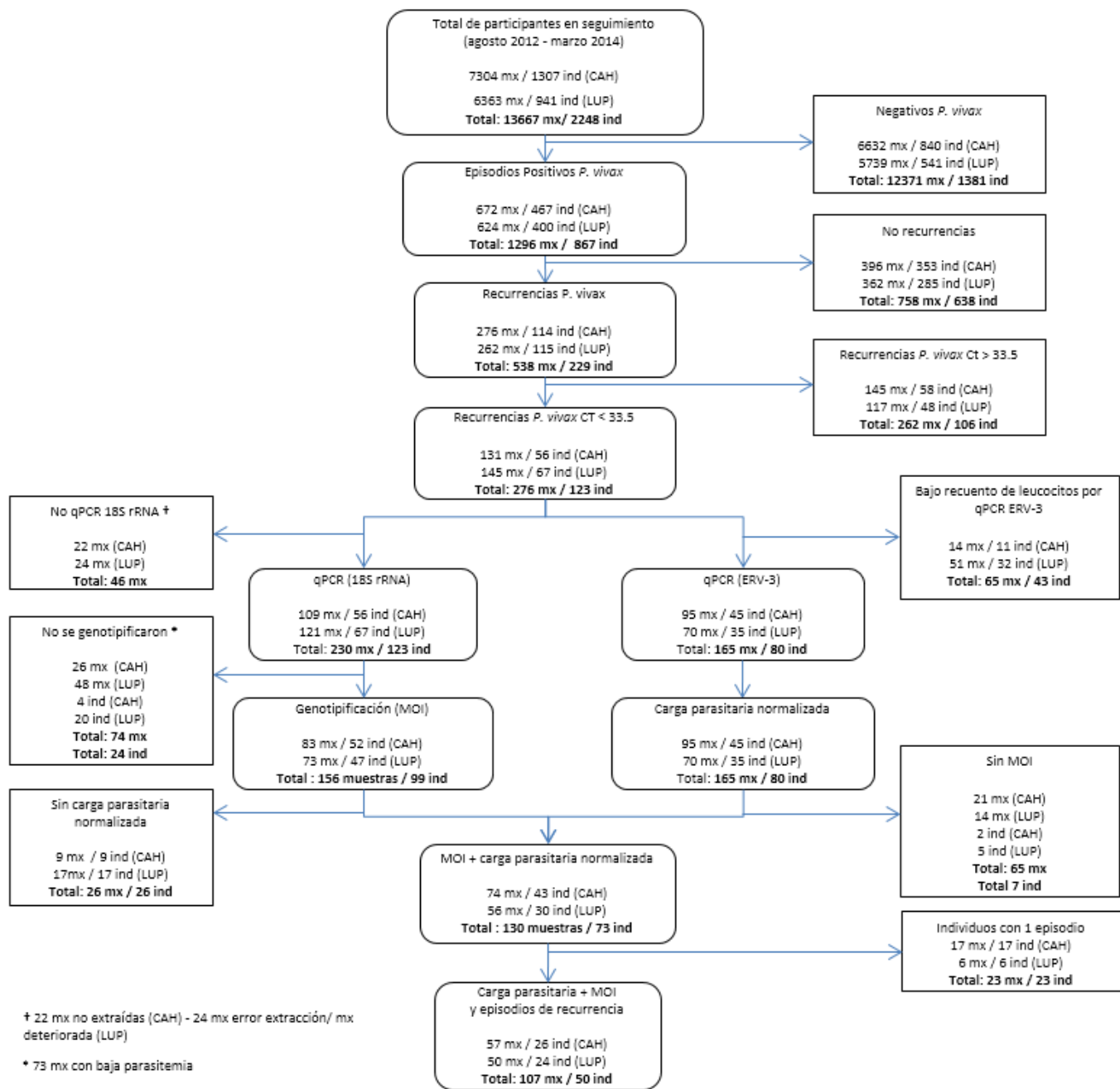


Figura 5. Flujo de muestras del estudio.

6.3.8.- AMPLIFICACIÓN DE GENOMA COMPLETO DE MUESTRAS CON BAJA PARASITEMIA

Luego de la cuantificación por qPCR de las muestras se pudo determinar la parasitemia de cada una de las mismas, sin embargo un grupo de muestras presentaba parasitemias muy bajas, las cuales iban a representar un problema al momento de realizar la genotipificación de los 17 microsatélites para la determinación de la MOI. Es por ese motivo que el grupo de muestras con parasitemias que tuvieron Ct mayores a 29.4, pasaron por una amplificación de genoma completo con el kit illustra GenomiPhi V2.

El protocolo fue el siguiente: Se agregó 9 μ L de *buffer* de muestra a 1 μ L de ADN extraído, se calentó la mezcla a 95°C por 3 minutos y luego se enfrió a 4°C; a continuación se preparó el master mix para las reacciones de amplificación mezclando 9 μ L de *buffer* de reacción con 1 μ L de enzima (todo se realizó sobre hielo), luego se mezcló 10 μ L del master mix de amplificación con cada una de las muestras (todo sobre hielo) y se incubaron las muestras a 30°C por 3 horas; luego de terminado el tiempo se calentaron las muestras a 65°C por 10 minutos y después se enfriaron a 4°C; finalmente se almacenaron las muestras amplificadas a -20°C.

De todas las muestras amplificadas un grupo de ellas, específicamente las que tuvieron Ct mayores de 33.5 fueron las que no se pudieron genotipificar luego de la amplificación debido principalmente a que presentaban una baja cantidad de

ADN blanco para la amplificación de los 17 microsatélites y por lo tanto no serían útiles para su genotipificación en el analizador genético ABI Prism 3100.

En las muestras con bajas parasitemias con Ct menores de 33.5 luego de la amplificación del genoma completo en estas se realizó una dilución 1/10 que se tuvo en cuenta para la posterior amplificación de los 17 microsatélites.

6.3.9.- GENOTIPIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES

Los 17 marcadores seleccionados para la genotipificación se muestran en el Anexo 14. Esta lista de microsatélites incluye 4 microsatélites reportados por Imwong (54), 5 por Karunaweera (61) y 8 nuevos microsatélites evaluados y estandarizados por el laboratorio de malaria de UPCH (datos no publicados) . Estos marcadores fueron evaluados en un estudio piloto que utilizó muestras de la comunidad de Cahuide, donde se observó que eran informativos al determinar sus valores de Heterocigosidad esperada (He) tomándose en cuenta aquellos que tuvieron valores por encima de 0.30 (Tabla 1).

Tabla 1. Lista de marcadores microsatélite seleccionados para el análisis que fueron evaluados en la comunidad de Cahuide.

MS	N° Alelos	Tamaño de alelos (pb)	He
11.162	6	179-211	0.560
Ch2.121	4	156-165	0.357
14.297	7	192-216	0.340
Ch14.3021	3	216-238	0.390
Ch14.2986	5	166-171	0.396
Ch14.3010	4	198-208	0.405
MS9	5	147-169	0.621
13.239	6	180-194	0.537
Ch14.2981	5	126-134	0.527
MS6	6	209-245	0.646
Ch7.1360	6	250-293	0.576
MS15	5	234-258	0.681
3.502	4	136-177	0.445
MS20	6	200-239	0.682
Ch2.122	4	193-208	0.584
MS4	4	187-199	0.648
Ch2.152	5	107-119	0.581

Los marcadores fueron amplificados usando *primers* específicos y las condiciones de amplificación modificadas a partir de las descritas por Karunaweera (55). Todos los *primers Forward* usados para la amplificación de los microsatélites fueron marcados con 4 diferentes fluoróforos (6FAM, NED, PET y VIC). Las condiciones de PCR difieren de la concentración de primer y la temperatura de hibridación de cada par de *primers* (Anexo 14).

El mix de reacción PCR fue el siguiente: 5 µL de producto de PCR, 0.5 ó 1 µM de cada primer (Anexo 14), 200 uM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂ 5 µL de *buffer*

Taq polimerasa 10X y 1 U de AccuStart™ *Taq* ADN Polimerasa (Quanta Biosciences) en un volumen final de 50 µL. Los parámetros de ciclado fueron los siguientes: 1 ciclo a 95°C por 5 min, 40 ciclos que consisten en 30 segundos de denaturación a 94°C, 40 segundos de hibridación a la temperatura correspondiente para cada marcador (Anexo 14) ,40 segundos de extensión a 72°C; y un ciclo final de 15 min a 72°C.

Luego de amplificar los 17 microsatélites para cada muestra, se procedió a la electroforesis capilar para determinar el número y tamaño de los alelos de cada marcador, datos que son necesarios para para obtener la MOI en cada una de las muestras. La lectura de los productos de microsatélites se realizó en 5 grupos de microsatélites, donde los *primers forward* estuvieron marcados con distintos fluoróforos (Anexo 14). Se realizaron diluciones de los productos de PCR de los microsatélites de cada grupo, para cada una de las muestras antes de realizar la electroforesis capilar. Se empezó con una dilución 1:20 en agua PCR de los microsatélites de cada grupo y posteriormente se determinó la dilución final (Anexo 14) para cada uno de estos después de realizar pruebas piloto de cada grupo en el analizador genético ABI Prism 3100.

Para la electroforesis capilar, se cargaron 2 µL de las diluciones de cada grupo de microsatélites y se mezclaron con 10 µL del estándar de tamaño GeneScan™ 500 LIZ™ dye previamente diluido 1:30 en formamida, en una placa de 96 pocillos. Una vez centrifugada la placa para evitar la presencia de burbujas, que interferirían con las lecturas del equipo, se procedió a calentar la placa a 94°C

por 3 minutos para permitir que las hebras de ADN doble se denaturen y posteriormente se enfrió la placa por 5 minutos antes de ingresarla al equipo, esto para permitir que la formamida impida la hibridación de las hebras de ADN con lo cual la presencia de hebras simple se vea incrementada. La determinación de los tamaños de los microsátélites amplificados fue determinada usando el software Peakscanner v1.0.

6.3.10.- ANÁLISIS DE ELECTROFEROGRAMAS

Los picos por encima de 50 unidades de intensidad de fluorescencia relativa (RFU) se consideraron productos de amplificación verdaderos, todos los picos por debajo de este se consideraron ruido de fondo, así como los picos secundarios que fueron menores que $1/3$ de altura que el pico principal fueron considerados como *stutter*, por el contrario los picos mayores que el 33% del pico principal fueron considerados como alelos, que en nuestro caso representó la presencia de una clona diferente.

6.3.11.- DETERMINACIÓN DE LA MOI

La multiplicidad de infección se estimó para cada muestra a partir del locus del microsátélite que presentó el mayor número de alelos (15,20). Una infección se definió como policlonal si existieron dos o más picos de alelos presentes en uno o más loci, en el que el pico secundario fue por lo menos un tercio de la altura de

la unidad de fluorescencia relativa del pico principal o el más alto (81). Esto nos permitió determinar el mínimo número de clonas que puedan estar presentes en las muestras, debido principalmente a que no se puede determinar con precisión cual es la combinación correcta de los alelos para la formación de los haplotipos en las muestras policlonales.

6.3.12.- DETERMINACIÓN DE LOS TIPOS DE RECURRENCIA POR *P. VIVAX* MEDIANTE EL ANÁLISIS DE STRUCTURE EN AMBAS COMUNIDADES.

Para realizar el análisis en los individuos con recurrencias de ambas comunidades, se evaluó primero una cantidad mayor de muestras, que incluyó a las de este estudio y otras adicionales de las comunidades de Cahuide y San José de Lupuna que abarcó un total de 205 y 199 respectivamente que fueron positivas para *P. vivax* de agosto 2012 a marzo 2014. El análisis en STRUCTURE v.2.3.4 (70) se llevó a cabo explorando un número de K de 1 a 15 (10 iteraciones cada uno), con un periodo de *burn-in* de 50000 iteraciones seguido de 150000 repeticiones de Cadenas de Markov y Montecarlo (MCMC), asumiendo un modelo de ancestría mixta y frecuencias alélicas correlacionadas. El número de K más probable se determinó de acuerdo a Evanno *et al* (82), calculando la tasa de cambio de K, ΔK , utilizando el programa STRUCTURE HARVESTER v.0.6.94 (83).

Con esta primera evaluación se determinó la estructura de ambas poblaciones y el número de *clusters* (K), con este número se procedió a determinar si los episodios de recurrencia pertenecían a *clusters* similares o diferentes a los del primer episodio. Los *clusters* genéticos se construyen a partir de los genotipos identificados, estimando para cada individuo la fracción de su genotipo que pertenece a cada *cluster*.

Los haplotipos con >85% de coeficiente de ancestría fueron asignados a un *cluster* específico para el análisis final de diferenciación de *cluster*. Se utilizó el programa CLUMPP v.1.1.2 (84) para generar un alineamiento del valor de asignación de *cluster* en cada repetición de K y finalmente con el programa DISTRUCT v.1.1 (85) se realizó una representación gráfica de los valores de asignación de *cluster* alineados, para las muestras que presentaron recurrencias.

6.4.- PLAN DE ANÁLISIS

6.4.1.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para los análisis estadísticos y su visualización gráfica se utilizó el paquete estadístico Stata v.14.

1. La normalidad de los datos de las variables dependientes de este estudio fue evaluada mediante histogramas y la prueba de Shapiro Wilk.
2. Con el fin de evaluar la correlación entre la carga parasitaria normalizada determinada por qPCR y la parasitemia determinada por gota gruesa se empleó el coeficiente de correlación de Pearson, para ello ambos valores de parasitemia se transformaron a logaritmo y luego fueron comparados.
3. Para comparar las parasitemias pareadas entre los episodios D0 y las recurrencias R1 y R2 y entre R1 y R2 se empleó el test de Wilcoxon debido a que los episodios estaban correlacionados, el análisis se realizó para el total y cada una de las comunidades Cahuide y Lupuna.
4. Para comparar las proporciones de episodios con MOI 2 entre las recurrencias R1 y R2 contra D0 así como entre D0 y R2 para ambas comunidades se empleó el test de Chi cuadrado.
5. Debido a que las observaciones no son independientes e igualmente distribuidas (iid), por ser un seguimiento de múltiples episodios de un mismo individuo, el análisis estadístico de los datos longitudinales (medidas repetidas)

fueron analizados mediante un modelo lineal generalizado mixto (GLMM). Debido a que la carga parasitaria es una variable de tipo conteo y sigue una distribución de Poisson, se evaluó la relación entre carga parasitaria y MOI mediante un modelo Log lineal con el programa estadístico Stata v.14. Este análisis permitió determinar los componentes de varianza intra-individuo y expresar las asociaciones en función del efecto intra-individuos y entre-individuos (86).

6.5.- CONSIDERACIONES ÉTICAS

Las muestras provienen del estudio “Impacto de los portadores asintomáticos en la epidemiología y control de la malaria en la Amazonía Peruana” (Código SIDISI: 57395), cuyo diseño de estudio, consentimiento y asentimiento informado se prepararon tomando en cuenta las regulaciones internacionales de ética y bioseguridad. La posibilidad del uso de dichas muestras para estudios posteriores fue considerada dentro del consentimiento/asentimiento informado administrado a los participantes el cual se encuentra registrado y aceptado por el comité Institucional de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, cuya carta de aceptación se anexa al final de esta tesis (Anexo 17).

El proyecto del cual se colectaron las muestras contaba con aprobación del comité Institucional de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, todos los participantes adultos incluidos en el estudio firmaron el consentimiento

informado y en el caso de los menores de edad fueron los padres o los tutores los que firmaron el consentimiento/asentimiento informado correspondiente, luego de esto se les procedió a recolectar las muestras sanguíneas.

VII.- RESULTADOS

7.1.- CORRELACIÓN CARGA PARASITARIA EN PAPEL FILTRO Y SANGRE TOTAL DETERMINADAS POR qPCR

Se observó correlación en la determinación de carga parasitaria normalizada por leucocitos mediante qPCR indistintamente de si la muestra era sangre total o sangre seca en papel filtro, el coeficiente de correlación de Pearson obtenido luego de comprar el logaritmo de las parasitemias fue de 0.902 (95% IC [0.8243-0.9466], $p < 0.0001$) (Anexo 13). Debido a la correlación encontrada se utilizó esta normalización de carga parasitaria para cuantificar todas las muestras que se seleccionaron para el presente estudio.

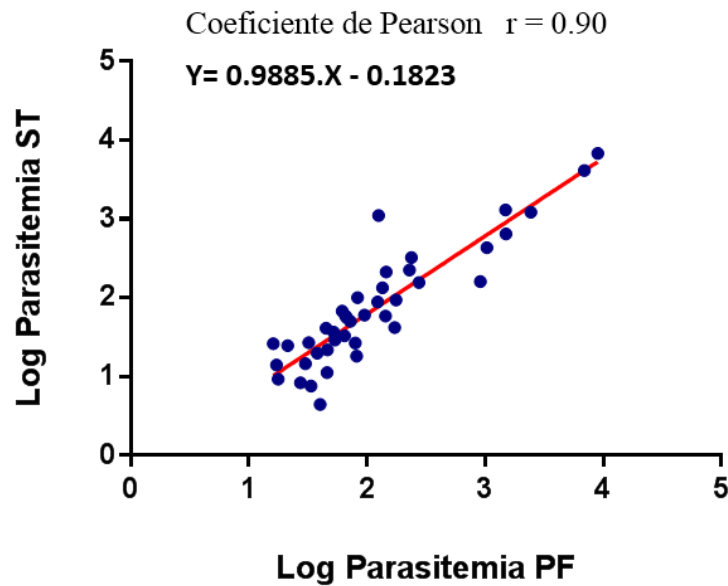


Figura 6. Correlación entre carga parasitaria en papel filtro (PF) y carga parasitaria en sangre total (ST) determinadas por qPCR.

7.2.- PARASITEMIAS RECURRENTES

Del total de 2248 individuos con seguimientos desde agosto del 2012 a marzo del 2014 entre ambas comunidades, el número de individuos con recurrencias y parasitemias con Ct menores de 33.5 fueron 123 que representaron un total de 276 muestras (Figura 5). Los 123 individuos seleccionados se dividieron en 56 de Cahuide, de los cuales 40 (71.43%) tuvieron un episodio de recurrencia, 13 (23.21%) tuvieron dos recurrencias, 2 (3.57%) tuvieron tres recurrencias y 1 (1.79%) tuvo cuatro recurrencias. De los 67 individuos de Lupuna, 57 (85.1%) tuvieron un episodio de recurrencia, 9 (13.4%) tuvieron dos recurrencias y 1 (1.5%) tuvo tres episodios de recurrencia. De este número de muestras seleccionadas para el estudio luego del proceso de cuantificación de *P. vivax* y ERV-3 por qPCR, algunas muestras no tuvieron resultado de parasitemia normalizada y otras no tuvieron resultado por qPCR y por lo tanto no pudieron genotipificarse (Figura 5). Adicionalmente se tuvo que tener en cuenta que las muestras tuvieran valor de carga parasitaria y MOI, necesarias para determinar su relación en el análisis estadístico.

Finalmente se seleccionaron los individuos que tuvieran más de un episodio con ambas determinaciones, es decir carga parasitaria y MOI. Como se puede observar en el Anexo 16, los individuos tuvieron como mínimo 2 episodios, el D0 y la recurrencia, sin embargo también se incluyeron dos individuos que tuvieron solo episodios R1 y R2. Es por ello que el número de muestras final que se obtuvo fue de 107 muestras, 57 de Cahuide y 50 de Lupuna, divididas en 26

individuos de la comunidad de Cahuide y 24 individuos de la comunidad de Lupuna (Anexo 16).

7.3.- CARGA PARASITARIA qPCR VS CARGA PARASITARIA GOTA GRUESA.

La carga parasitaria normalizada determinada por qPCR para las muestras de este estudio fueron correlacionadas con los resultados de parasitemia determinados por gota gruesa (coeficiente de correlación de Pearson de 0.739, 95% IC [0.6369-0.8167], $p < 0.0001$) (Figura 7). Adicionalmente se puede observar que las muestras de los individuos que tuvieron episodios febriles se agrupan en la parte superior de la gráfica con un coeficiente de correlación de Pearson de 0.6181 (95% IC [0.3834-0.7779], $p < 0.0001$), mientras que las muestras de los individuos que tuvieron episodios afebriles se agrupan en la parte inferior con un coeficiente de correlación de Pearson de 0.6839 (95% IC [0.5220-0.7982], $p < 0.0001$).

Además se puede observar un grupo de muestras con parasitemias negativas por gota gruesa pero con resultados positivos por qPCR tanto en individuos febriles como afebriles, que tienen un rango variable de valores.

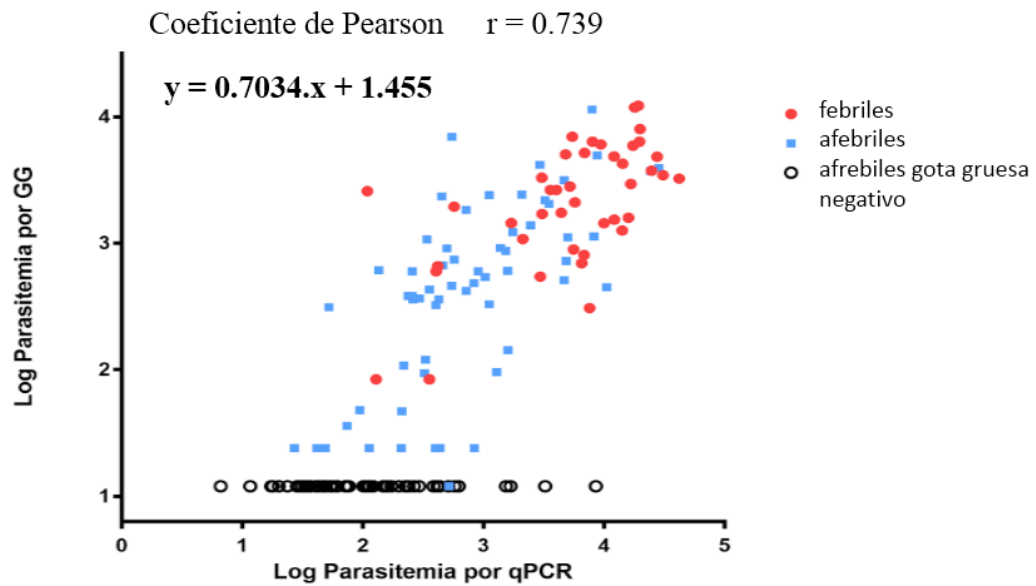


Figura 7. Correlación de carga parasitaria normalizada por qPCR vs la determinada por gota gruesa (GG).

7.4.- CARGA PARASITARIA EN LOS EPISODIOS DE RECURRENCIAS DE LOS INDIVIDUOS DE AMBAS COMUNIDADES.

Existe una tendencia a la disminución en la carga parasitaria en los episodios de recurrencia cuando se toman en cuenta ambas comunidades. Como se observa en la Figura 8 (A), las diferencias entre las parasitemias de cada uno de los episodios nos indican que en su gran mayoría existe una disminución en la parasitemia de las recurrencias. Para la Diferencia 1 (parasitemia R1-D0) el 54.84% tuvieron diferencias negativas es decir las parasitemias disminuyeron en la primera recurrencia (R1), sin embargo el 45.16% tuvieron diferencias positivas

lo que indica que estas parasitemias aumentaron en la primera recurrencia (R1). Para la Diferencia 2 (parasitemia R2-R1), el 66.67% tuvieron diferencias negativas o disminuyeron en sus parasitemias y el 33.33% tuvieron diferencias positivas o aumentaron en sus parasitemias. Por ultimo para la Diferencia 3, el 100% tuvieron diferencias negativas y para la Diferencia 4 que represento un solo episodio este tuvo una diferencia positiva.

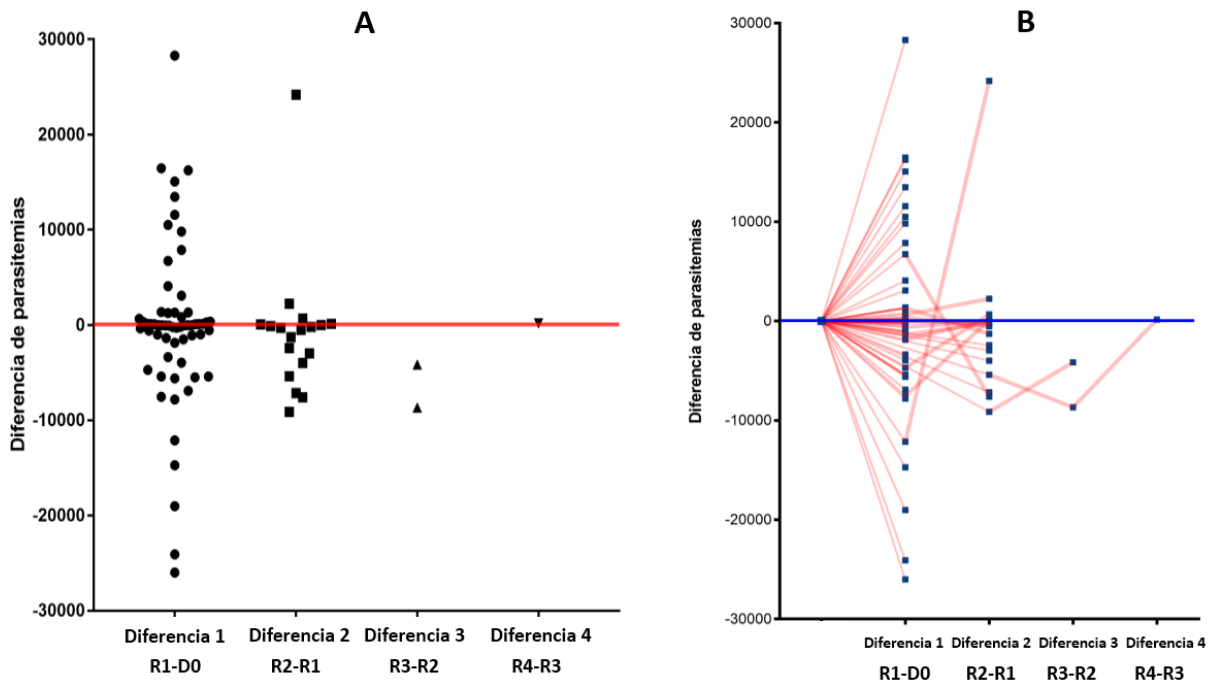


Figura 8. Carga parasitaria en los episodios de recurrencia de los individuos de las comunidades de Cahuide y Lupuna.

En la Figura 8 (B), al unir todas las diferencias para los episodios de cada individuo se puede observar también esta tendencia a la disminución de las parasitemias en las recurrencias; sin embargo también se puede ver que para algunos individuos las parasitemias aumentan en las recurrencias. De la misma manera esta tendencia a la disminución en las parasitemias en los episodios de recurrencia respecto al primer episodio, puede observarse tanto en los episodios patentes, como subpatentes para ambas comunidades, como se puede observar en la Figura 9 las medianas de las parasitemias patentes tienden a disminuir en las recurrencias, sin embargo las medianas de los episodios subpatentes se puede observar mejor como disminuyen en las recurrencias respecto del primer episodio (D0), no obstante estos resultados no fueron significativos.

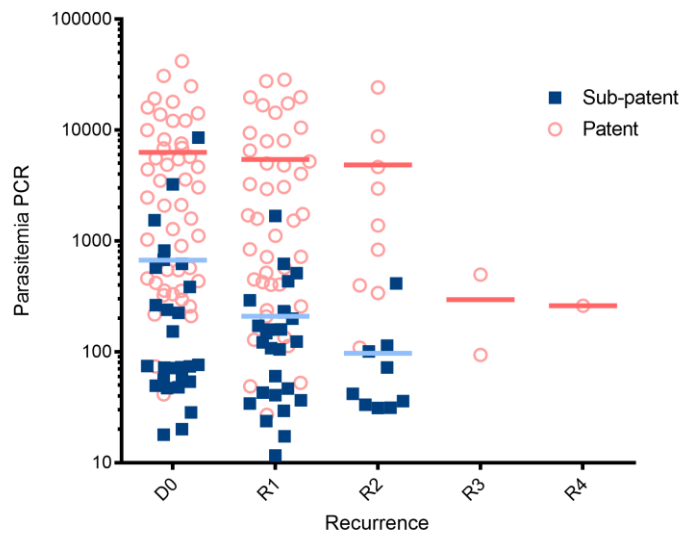


Figura 9. Carga parasitaria en los episodios de recurrencia patentes y subpatentes de los individuos de las comunidades de Cahuide y Lupuna.

7.5.- CARGA PARASITARIA VS RECURRENCIA DE MALARIA.

Luego del análisis estadístico de comparar las parasitemias entre el primer episodio (D0) versus cada una de las recurrencias y entre recurrencias (R1 y R2) para cada una de las comunidades así como para las dos comunidades juntas, no se encontraron diferencias significativas. Como se puede observar por los valores de p-value del test de Wilcoxon, tomando en cuenta de que ambas muestras estén correlacionadas, la comparación solo resulto significativa entre D0 y R2 para la comunidad de Cahuide, de la misma manera entre D0 y R2 para ambas comunidades. A pesar de ello estos resultados son una primera aproximación de que las parasitemias en los episodios de recurrencia tienden a ser menores en ambas comunidades (Tabla 2).

Tabla 2. Comparación carga parasitaria entre episodios de recurrencia de los individuos de Cahuide y Lupuna y en ambas comunidades juntas.

	Cahuide	Lupuna	Total
	Wilcoxon p-value	Wilcoxon p-value	Wilcoxon p-value
D0 vs. R1	0.3099	0.0585 *	0.5789
R1 vs. R2	0.3105	0.6002	0.6002
D0 vs. R2	0.0208 **	0.7150	0.0409 **

Análisis solo con D0, R1 y R2; Wilcoxon test; * p<0.2; ** p<0.05.

7.6.- MOI EN LOS EPISODIOS DE RECURRENCIA

Los resultados indican que la proporción de episodios con MOI de 2 es estadísticamente diferente entre los primeros episodios (D0) y la primera recurrencia (R1) con un p -value = 0.003, con una disminución entre ambos episodios; sin embargo entre el primer episodio (D0) y la segunda recurrencia (R2) no hay diferencia estadística en la proporción de infecciones con MOI de 2 con un p -value = 0.907. Por ultimo entre la primera recurrencia (R1) y la segunda recurrencia (R2) la proporción de infecciones con MOI 2 es estadísticamente diferente con un p -value = 0.030; pero en este caso aumenta entre ambos episodios (Figura 10).

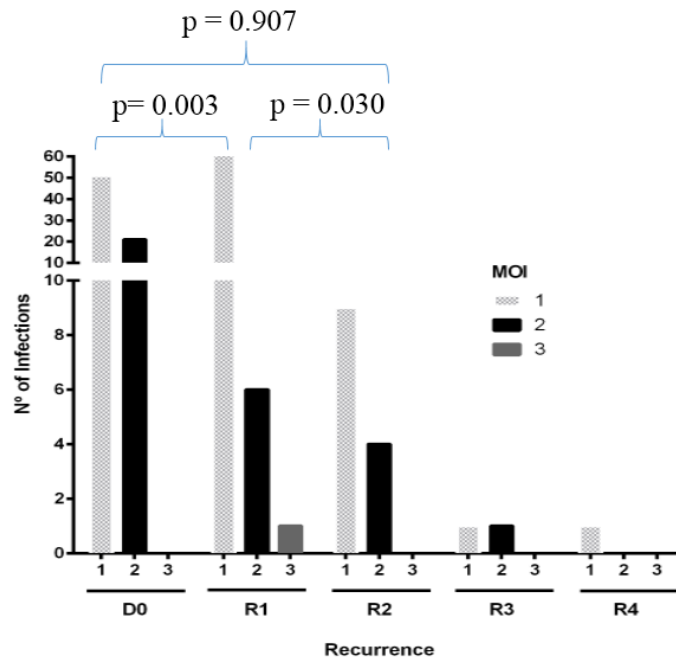


Figura 10. Multiplicidad de infección en los episodios de recurrencias de los individuos de ambas comunidades.

7.7.- MOI Y CARGA PARASITARIA EN LOS INDIVIDUOS CON RECURRENCIAS DE AMBAS COMUNIDADES.

En los individuos con recurrencias de ambas comunidades se observa que a medida que aumenta la MOI se da una disminución en la parasitemia (Figura 11), cuando se compararon las medianas de ambos episodios. De manera adicional se pudo observar que la MOI no se encuentra asociada a la sintomatología, específicamente a la fiebre ($p\text{-value} = 0.556$).

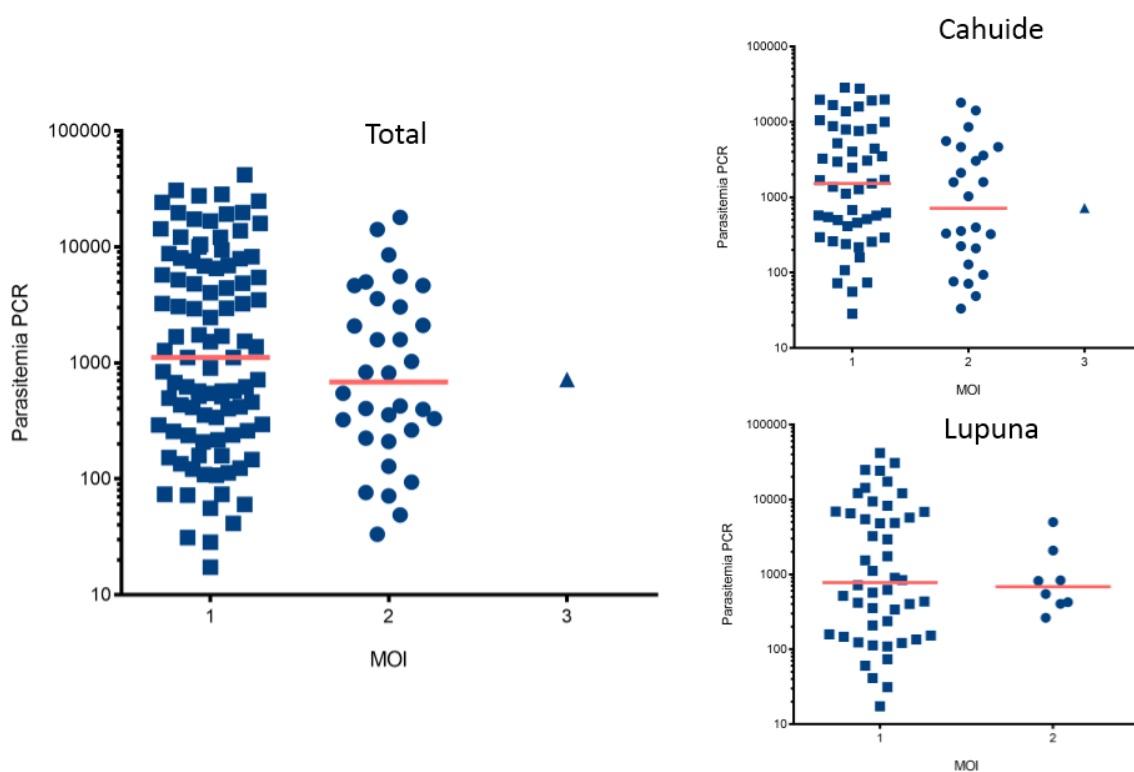


Figura 11. MOI y carga parasitaria en los individuos con recurrencias de ambas comunidades.

7.8.- RELACIÓN CARGA PARASITARIA Y MOI EN LOS INDIVIDUOS CON RECURRENCIAS DE AMBAS COMUNIDADES.

Luego de realizar el Modelo lineal generalizado mixto (GLMM) utilizando una regresión de Poisson, y 12 variables para el modelo univariado (Tabla 3) se pudo observar que MOI, tiempo entre recurrencias (días), fiebre, sexo, edad, ser gota gruesa positivo, escalofríos, dolor de cabeza y recurrencias estuvieron asociados a la parasitemia ($p < 0.001$). No obstante solo 7 variables se mantuvieron asociadas en el modelo ajustado (Tabla 4).

Tabla 3. Modelo univariado GLMM de factores asociados a la parasitemia en individuos con recurrencia por *P. vivax*.

	Modelo crudo						
	Efectos fijos			p-value	Efectos aleatorios		
	Coef.	exp.(Coef.) IRR	IC 95%		est.	s.e.	IC 95%
MOI	-0.594	0.552	(0.547 - 0.557)	<0.001	3.189	0.529	(2.304 - 4.413)
Tiempo entre recurrencias (días)	-0.001	0.999	(0.999 - 0.999)	<0.001	3.394	0.537	(2.488 - 4.629)
Fiebre	-1.311	0.270	(0.267 - 0.272)	<0.001	2.456	0.389	(1.800 - 3.351)
Sexo	-3.072	0.046	(0.037 - 0.057)	<0.001	7.083	1.141	(5.166 - 9.711)
Edad	0.072	1.075	(1.070 - 1.080)	<0.001	5.366	0.856	(3.925 - 7.337)
Gota gruesa	2.070	7.924	(7.805 - 8.045)	<0.001	2.105	0.333	(1.543 - 2.871)
Escalofríos	-1.127	0.324	(0.322 - 0.327)	<0.001	2.703	0.428	(1.982 - 3.687)
Dolor de cabeza	-0.795	0.452	(0.448 - 0.455)	<0.001	2.936	0.465	(2.153 - 4.005)
Tiempo en la comunidad	-0.013	0.987	(0.959 - 1.016)	0.387	3.383	0.536	(2.481 - 4.615)
Malaria vivax previa en su vida	0.019	1.019	(0.845 - 1.229)	0.845	3.413	0.540	(2.502 - 4.655)
Viajo en el ultimo mes mas 10Km	-0.511	0.600	(0.071 - 5.049)	0.638	3.406	0.539	(2.497 - 4.645)
Recurrencia					3.488	0.552	(2.557 - 4.758)
R1	-0.912	0.826	(0.821 - 0.830)	<0.001			
R2	-0.392	0.676	(0.668 - 0.684)	<0.001			
R3	-3.735	0.024	(0.022 - 0.026)	<0.001			
R4	-3.957	0.019	(0.017 - 0.022)	<0.001			

Modelo de regresion lineal multinivel
p-value del Test de Wald

Se puede observar que la relación entre la MOI y carga parasitaria en estos individuos es inversa. Como se puede observar en la Tabla 3 la MOI así como la fiebre, el tiempo entre recurrencia, escalofríos y dolor de cabeza se encuentran asociados a la parasitemia con valores significativos de p-value. Sin embargo en la Tabla 4 se puede observar que ajustando la relación con el efecto de las demás variables se mantiene esta relación inversa entre la carga parasitaria y MOI. En promedio, la carga parasitaria de infecciones policlonales (MOI=2) es 53% menor que la carga parasitaria de infecciones monoclonales (MOI=1) ajustado por tiempo entre recurrencias (días), tener fiebre, ser gota gruesa positivo, tener escalofríos, tener dolor de cabeza y el número de recurrencia. Adicionalmente se obtuvo que el poder estadístico calculado para el tamaño de muestra de este estudio utilizando el método de *bootstrap* fue de 99%.

Tabla 4. Modelo multivariado GLMM de factores asociados a la parasitemia en individuos con recurrencia por *P. vivax*.

	Modelo ajustado						
	Efectos fijos				Efectos aleatorios		
	Coef.	exp.(Coef) IRR	IC 95%	p-value	est.	s.e.	IC 95%
Constante	7.326	1519.157	(1091.049 - 2115.246)	<0.001	2.069	0.344	(1.495 - 2.865)
MOI	-0.736	0.479	(0.473 - 0.485)	<0.001			
Tiempo entre recurrencias (días)	0.002	1.002	(1.002 - 1.002)	<0.001			
Fiebre	-1.050	0.350	(0.345 - 0.355)	<0.001			
Gota gruesa	1.746	5.730	(5.617 - 5.845)	<0.001			
Escalofríos	-0.017	0.983	(0.970 - 0.996)	0.011			
Dolor de cabeza	0.405	1.499	(1.479 - 1.519)	<0.001			
Recurrencia							
R1	-0.545	0.580	(0.570 - 0.589)	<0.001			
R2	-0.327	0.721	(0.704 - 0.737)	<0.001			
R3	-3.837	0.022	(0.020 - 0.024)	<0.001			
R4	-3.747	0.024	(0.021 - 0.027)	<0.001			

Modelo de regresión lineal multinivel
p-value del Test de Wald

7.9.- TIPOS DE RECURRENCIA POR *P. VIVAX* MEDIANTE EL ANÁLISIS DE STRUCTURE EN AMBAS COMUNIDADES.

La estructuración poblacional determinada para Cahuide y Lupuna usando nueve marcadores microsátélites (Ch 2.152, 3.502, MS15, MS4, MS9, MS20, MS6, 13.239 y 14.297) fue determinada por el laboratorio de Malaria de la UPCH, encontrándose la presencia de 4 *clusters* (K de 4) en la totalidad de muestras procesadas entre las dos comunidades (Datos aún no publicados) luego del análisis con el STRUCTURE HARVESTER v.0.6.94 (83). A partir de esta determinación se procedió a seleccionar las muestras de pacientes recurrentes y se les agrupó de acuerdo a su orden cronológico de aparición. El valor de coeficiente de ancestría (Q) promedio entre todas las corridas para cada muestra se determinó mediante el programa CLUMPP v.1.1.2 (84), y la agrupación de cada episodio recurrente por individuo se graficó en el programa DISTRUCT v.1.1 (85) (Figura 12).

Solo 44 individuos pudieron ser graficados en el programa DISTRUCT v.1.1, de los 24 de Cahuide, se pudo observar que 6 individuos tuvieron recurrencias que coincidieron en el mismo *cluster*, lo que serían recurrencias homologas, 15 individuos tuvieron recurrencias con *clusters* diferentes a los del primer episodio, lo que se interpreta como recurrencias heterólogas, 1 individuo tuvo dos recurrencias homologas, otro individuo tuvo 2 recurrencias heterólogas y por ultimo un individuo tuvo tres recurrencias heterólogas.

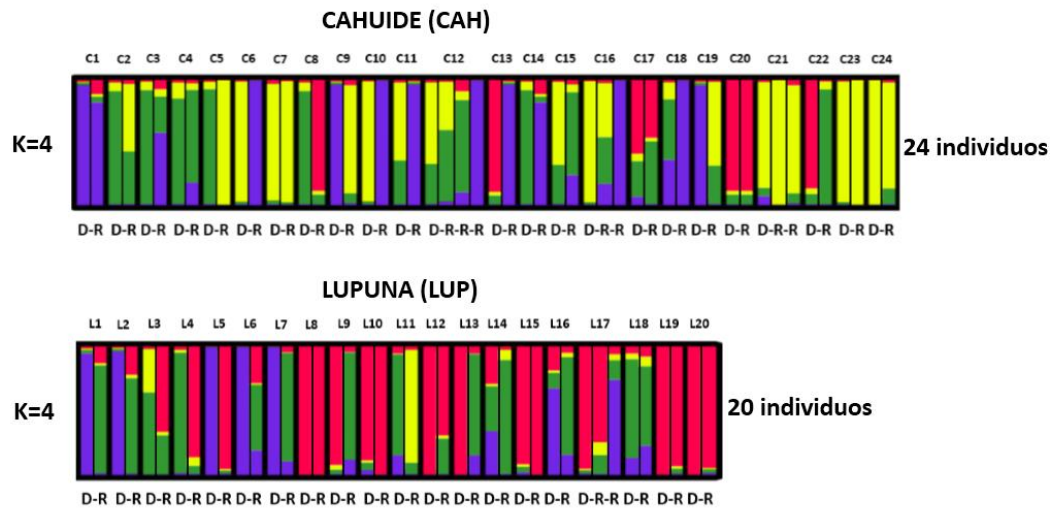


Figura 12. Estructura poblacional de los episodios de recurrencia de los individuos de Cahuide y Lupuna.

Para Lupuna de 20 individuos, 6 tuvieron recurrencias homólogas, 13 tuvieron recurrencias heterólogas y por último un individuo tuvo un episodio R1 homólogo y un episodio R2 heterólogo. Los episodios de recurrencia pueden pertenecer al mismo *cluster* con lo que es muy probable que sean recurrencias homólogas, relapsos homólogos o en última instancia reinfecciones con parásitos que pertenecen al mismo *cluster*. Por otro lado también se puede observar recurrencias que pertenecen a *clusters* distintos a los del primer episodio, lo que corresponde a que la mayoría de recurrencias se dieron en las temporadas de alta transmisión de malaria para ambas comunidades, lo que involucra una mayor

diversidad de los parásitos en ese tiempo (Tabla 5). Adicionalmente se pudo observar que más de la mitad de las recurrencias se dieron en las temporadas de alta transmisión para ambas comunidades (Figura 12).

Tabla 5. Tipos de recurrencias en los individuos de las comunidades de Cahuide y Lupuna.

	N° Individuos	N° Recurrencias	Tipo
	6	1	Homólogas
Cahuide	15	1	Heterólogas
	1	2	Homólogas
	1	2	Heterólogas
	1	3	Heterólogas
Lupuna	6	1	Homólogas
	13	1	Heterólogas
	1	2	Homologa/Heteróloga

VIII.- DISCUSIÓN

La carga parasitaria refleja el resultado de la interrelación entre factores del hospedero y del parásito. En este estudio uno de los factores del parásito estuvo representado por la presencia de MOI en los episodios de malaria (10), la misma que luego de relacionarse con otros factores tuvo de alguna manera un efecto en la parasitemia del hospedero. En base a los resultados de este estudio se rechaza la hipótesis de que la relación entre carga parasitaria y MOI es directa, debido a que se determinó que a mayor MOI la carga parasitaria disminuye. Este resultado va acorde con lo que han reportado otros estudios evaluando *P. falciparum* en zonas de alta transmisión (67). Sin embargo muchos otros estudios no encuentran aún o reportan una relación directa, utilizando principalmente marcadores antigénicos para determinar la MOI en *P. falciparum* (43).

Cabe recalcar que estos estudios previos no se realizaron en individuos recurrentes y además fueron llevados a cabo en niños, donde el sistema inmune es inmaduro y donde además se tiene poca respuesta de anticuerpos debido a la poca probabilidad de infecciones previas (43,67), situaciones que podrían también influir en la relación de carga parasitaria y MOI encontrada. Sin embargo en este estudio también se encontró una relación inversa entre carga parasitaria y MOI cuando se realizó el análisis en individuos menores de 15 años, los cuales representaron la población infantil de ambas comunidades (ANEXO 15), esto puede deberse a las repetidas infecciones que pueden darse en este

grupo de individuos, lo que generaría una memoria inmunológica que controla las parasitemias. En un escenario de alta transmisión para *P. vivax* se observa una relación directa entre la parasitemia y la presencia de múltiples clones del parásito pero con resultados no significativos (14).

Esta relación inversa entre MOI y carga parasitaria en estos individuos con recurrencias, podría explicarse, por la naturaleza de *P. vivax* en estas dos comunidades de la Amazonia Peruana. Se ha observado que en Cahuide y Lupuna *P. vivax* tiene una moderada diversidad genética y presenta estructura poblacional (datos aún no publicados), además de la presencia de infecciones con multiplicidad de infección. La disminución en la carga parasitaria ante el aumento en la multiplicidad de infección puede ser explicada en términos de la variabilidad antigénica de las cepas circulantes en la Amazonía Peruana.

Es posible que estas clonas no sean tan diferentes antigénicamente, debido a una conservación en los antígenos de membrana, muchos de los cuales son estudiados como candidatos a vacuna (87). Esto se explicaría también debido a que los anticuerpos son un componente importante de la inmunidad adquirida de forma natural, y son considerados como biomarcadores tanto de inmunidad como de exposición (88).

Además los potenciales objetivos de los anticuerpos incluyen a los antígenos de *P. vivax* expresados en los múltiples estadios del parásito (esporozoíto, merozoíto y gametocitos). Todo esto sugiere que en individuos con exposición previa a

malaria, el sistema inmune de estos podría responder y controlar estas parasitemias en los episodios de recurrencia a pesar de presentar multiplicidad de infección.

Adicionalmente en áreas endémicas para *P. vivax*, la prevalencia, la cantidad de infecciones y la incidencia de malaria sintomática disminuye con la edad. Debido a que cuando esta se incrementa se da una adquisición de inmunidad natural que se desarrolla después de repetidas exposiciones que es más común a mayor edad (89). No obstante esta inmunidad no es esterilizante, es decir no protege de la infección, pero sí reduce la parasitemia sanguínea y por consiguiente los síntomas clínicos (89). Lo que explicaría la gran cantidad de infecciones asintomáticas en estas zonas endémicas (3).

De manera adicional no se encontró relación entre MOI y fiebre en el presente estudio, esto difiere con los resultados de otros estudios que han encontrado una asociación entre MOI y malaria sintomática para *P. falciparum* (10,90). Kiwuwa et al encontraron una asociación significativa alta entre MOI y malaria severa por *P. falciparum* en Kampala, Uganda (90) y más recientemente se encontró asociación entre MOI y malaria severa por *P. vivax* en Colombia (23); sin embargo otros no han encontrado asociación, lo que sugiere que las consecuencias clínicas y epidemiológicas de la MOI son importantes, pero todavía no se entienden completamente. La verdadera relación entre MOI y desarrollo de enfermedad puede diferir entre *P. vivax* y *P. falciparum*, y el desarrollo de enfermedad puede ser más complicada por infecciones simultáneas

de ambas especies (91). Conocer la distribución de MOI a través de la población de pacientes puede revelar mucho acerca de la naturaleza de la transmisión de la enfermedad y epidemiología.

A pesar de que la tendencia es la reducción de la MOI en zonas de baja transmisión, no siempre se cumple para *P. vivax*, debido a que son comunes las infecciones policlonales aun en zonas de baja transmisión (16). Estas podrían ser el resultado de la activación de hipnozoítos con genotipos diferentes producto de infecciones previas (59,92).

Por otro lado la correlación entre la determinación de carga parasitaria normalizada utilizando ERV-3 mediante qPCR y la determinación por gota gruesa, es un resultado que concuerda con lo determinado por Tran *et al* 2014 que obtuvo un coeficiente de correlación de Pearson de 0.58 y 0.70 cuando comparó los logaritmos de parasitemias de *P. falciparum* determinados por microscopia y *nested* qPCR en pacientes asintomáticos y sintomáticos respectivamente. A diferencia del estudio de Tran *et al* 2014, se obtuvo mejor coeficiente de correlación en las muestras afebriles que en las febriles. Adicionalmente algunas muestras tanto de episodios febriles y afebriles tuvieron parasitemias por debajo del límite de detección de gota gruesa con resultados determinados solo por qPCR que comprenden un espectro considerable, lo que nos confirma que la qPCR resulta ser útil para la determinación de estos episodios submicroscópicos en malaria por *P. vivax* (93) pero por debajo de este límite la cuantificación de parásitos no es confiable.

Se tiene que considerar además que el resultado de gota gruesa esta subestimado debido a que no se toma en cuenta la cantidad total de células al cuantificar los esquizontes, por el contrario el qPCR si detecta la cantidad real de parásitos (35).

Estos resultados nos indican que esta alternativa de cuantificación, mejorando las limitaciones como el control sobre el volumen sanguíneo recolectado en el papel filtro para cada individuo, o el correcto almacenamiento de las muestras que puede influir en la conservación de las células tanto parásitos como leucocitos, nos puede otorgar información útil como la parasitemia la cual puede ser comparable con los resultados reportados por la mayoría de investigaciones que utilizan gota gruesa y reportan sus resultados en parásitos/ μ L de sangre (42). El utilizar una muestra como es la sangre seca en papel filtro para obtener un resultado de parasitemia con un resultado comparable, es una alternativa muy prometedora.

Por otro lado el método de genotipificación y el uso de marcadores utilizados como ya se mencionó, puede afectar la estimación de MOI, por lo que aún es necesario una estandarización de las metodologías de genotipificación y los diseños de estudio, como por ejemplo las edades de los individuos en seguimiento, lo cual sería crucial para poder comparar los resultados encontrados entre los sitios de estudio (16).

La no diferencia estadística encontrada entre las proporciones de infecciones con MOI 2 entre D0 y R2, podría deberse a que en su mayoría estos episodios sean

reinfecciones, sumado a que por el diseño de muestreo estos episodios se dieron después de un tiempo considerable (desde tres a nueve meses) el cual permite que se den reinfecciones, donde estas pudieran ser por clonas distintas con lo cual la MOI no disminuiría sino por el contrario aumentaría. Esto concuerda con la mayor presencia de recurrencias heterólogas encontrada, en este caso reinfecciones o relapsos heterólogos (Figura 12); pero debido a la característica de las cepas de *P. vivax* de la Amazonia Peruana, las cuales corresponden a cepas templadas, estas recurrencias también podrían ser debidas a relapsos heterólogos dado que las recurrencias se dan en espacios de tiempo (aproximadamente nueve meses) reportados para ese tipo de cepa (38).

Por ultimo esta dificultad en la determinación del tipo de recurrencia es uno de los problemas característicos en la malaria por *P. vivax* producto de la presencia de hipnozoítos, que pueden ocasionar tanto relapsos homólogos como heterólogos (19,94,95). La posibilidad de que las recurrencias sean debido a recrudescencias se ve descartada también por el diseño del estudio, dado que la toma de muestra trimestral de los individuos disminuye totalmente esta posibilidad.

Con todo esto resulta importante mejorar las medidas de control en el tratamiento de las infecciones por *P. vivax* no solo en individuos gota gruesa positivos, ya que como se pudo observar existen parasitemias recurrentes submicroscópicas en individuos que no pudieron ser detectados por microscopia y por ende recibir tratamiento. Estas parasitemias pueden permanecer en niveles no detectables y de

manera asintomática por largos periodos de tiempo. Además debido a la presencia de relapsos homólogos o heterólogos, sumado a la posibilidad de reinfecciones, que a pesar de tener multiplicidad de infección también pueden ser controladas y permanecer en niveles submicroscópicos, convierte a estos individuos en potenciales reservorios del parasito que continuarían contribuyendo en la transmisión de la enfermedad.

IX. CONCLUSIONES

- La carga parasitaria determinada por qPCR y normalizada por ERV-3 en muestras de sangre en papel filtro correlaciona con la determinación de parasitemia por gota gruesa.
- En ambas comunidades se observaron recurrencias de malaria por *P. vivax*, y la presencia de episodios policlonales.
- La relación entre carga parasitaria y MOI es inversa, lo que puede deberse a que a pesar de tener clonas genéticamente diferentes, es probable que tengan antígenos de membrana conservados.
- La mayoría de recurrencias fueron heterólogas, probablemente son reinfecciones por clonas diferentes, debido principalmente al diseño del estudio del cual provienen las muestras el cual tuvo una determinación trimestral de los casos y también al tiempo entre episodios de recurrencias.
- Debido a que el tipo de clona de *P. vivax* de la Amazonia Peruana es templada, es posible que estas recurrencias sean también relapsos heterólogos por clonas diferentes adquiridas en el primer episodio o en una infección previa no reportada.

X. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

- Debido al diseño macro del cual provienen las muestras no se pudieron evaluar muestras de todos los meses del seguimiento.
- No se pudo determinar la MOI en las muestras con parasitemias con Ct mayores de 33.5 debido a la baja concentración ADN.
- Debido al método de genotipificación y a la elevada cantidad de alelos nulos, resulto difícil la discriminación entre episodios de relapsos y reinfecciones.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. WHO. World Malaria Report 2015. World Health Organization. 2015.
2. Ministerio de Salud - Dirección General de Epidemiología. Sistema de vigilancia epidemiológica DRE SVE. 2015.
3. Roshanravan B, Kari E, Gilman RH, Cabrera L, Lee E, Metcalfe J, et al. Endemic malaria in the Peruvian Amazon region of Iquitos. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;69(1):45–52.
4. McCollum AM, Soberon V, Salas CJ, Santolalla ML, Udhayakumar V, Escalante AA, et al. Genetic variation and recurrent parasitaemia in Peruvian *Plasmodium vivax* populations. *Malar J.* 2014;13(1):67.
5. Karunaweera ND, Carter R, Grau GE, Mendis KN. Demonstration of anti-disease immunity to *Plasmodium vivax* Malaria in Sri Lanka using a quantitative method to assess clinical disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;58(2):204–10.
6. Peyerl-Hoffmann G, Jelinek T, Kilian A, Kabagambe G, Metzger WG, Von Sonnenburg F. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* and its relationship to parasite density in an area with different malaria endemicities in West Uganda. *Trop Med Int Heal.* 2001;6(8):607–13.
7. Smith T, Beck HP, Kitua A, Mwankusye S, Felger I, Fraser-Hurt N, et al. Age dependence of the multiplicity of *Plasmodium falciparum* infections and of other malariological indices in an area of high endemicity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999;93 Suppl 1:15–20.
8. Bendixen M, Msangeni HA, Pedersen B V., Shayo D, Bedker R. Diversity of *Plasmodium falciparum* populations and complexity of infections in relation to transmission intensity and host age: A study from the Usambara Mountains, Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001;95(2):143–8.
9. Akter J, Thriemer K, Khan W a, Sullivan DJ, Noedl H, Haque R. Genotyping

of *Plasmodium falciparum* using antigenic polymorphic markers and to study anti-malarial drug resistance markers in malaria endemic areas of Bangladesh. *Malar J.* 2012;11(1):386.

10. Vafa M, Troye-Blomberg M, Anchang J, Garcia A, Migot-Nabias F. Multiplicity of *Plasmodium falciparum* infection in asymptomatic children in Senegal: relation to transmission, age and erythrocyte variants. *Malar J.* 2008;7:17.
11. Basco LK, Ringwald P. Molecular epidemiology of malaria in Yaounde, Cameroon. VIII. Multiple *plasmodium falciparum* infections in symptomatic patients. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;65(6):798–803.
12. Zwetyenga J, Rogier C, Tall A, Fontenille D, Snounou G, Trape JF, et al. No influence of age on infection complexity and allelic distribution in *Plasmodium falciparum* infections in Ndiop, a Senegalese village with seasonal, mesoendemic malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;59(5):726–35.
13. Parobek CM, Bailey JA, Hathaway NJ, Socheat D, Rogers WO, Juliano JJ. Differing Patterns of Selection and Geospatial Genetic Diversity within Two Leading *Plasmodium vivax* Candidate Vaccine Antigens. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(4).
14. Cole-tobian JL, Michon P, Dabod E, Mueller I, King CL. Dynamics of Asymptomatic *Plasmodium vivax* Infections and Duffy Binding Protein Polymorphisms in Relation to Parasitemia Levels in Papua New Guinean Children. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77(5):955–62.
15. Sutton PL. A call to arms: on refining *Plasmodium vivax* microsatellite marker panels for comparing global diversity. *Malar J.* 2013;12:447.
16. Escalante AA, Ferreira MU, Vinetz JM, Volkman SK, Cui L, Gamboa D, et al. Malaria Molecular Epidemiology: Lessons from the International Centers of Excellence for Malaria Research Network. *Am J Trop Med Hyg.* 2015;93(3 Suppl):79–86.
17. 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;9:151.

18. Koepfli C, Mueller I, Marfurt J, Goroti M, Sie A, Oa O, et al. Evaluation of *Plasmodium vivax* genotyping markers for molecular monitoring in clinical trials. *The Journal of infectious diseases.* 2009.
19. Imwong M, Snounou G, Pukrittayakamee S, Tanomsing N, Kim JR, Nandy A, et al. Relapses of *Plasmodium vivax* infection usually result from activation of heterologous hypnozoites. *J Infect Dis.* 2007;195(7):927–33.
20. Thanapongpichat S, McGready R, Luxemburger C, Day NPJ, White NJ, Nosten F, et al. Microsatellite genotyping of *Plasmodium vivax* infections and their relapses in pregnant and non-pregnant patients on the Thai-Myanmar border. *Malar J.* 2013;12(1):275.
21. Branch O, Casapia WM, Gamboa D V, Hernandez JN, Alava FF, Roncal N, et al. Clustered local transmission and asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria infections in a recently emerged, hypoendemic Peruvian Amazon community. *Malar J.* 2005;4:27.
22. Van den Eede P, Soto-Calle VE, Delgado C, Gamboa D, Grande T, Rodriguez H, et al. *Plasmodium vivax* sub-patent infections after radical treatment are common in Peruvian patients: results of a 1-year prospective cohort study. *PLoS One.* 2011;6(1):e16257.
23. Pacheco MA, Lopez-Perez M, Vallejo AF, Herrera S, Arévalo-Herrera M, Escalante AA. Multiplicity of Infection and Disease Severity in *Plasmodium vivax*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(1):e0004355.
24. Kyabayinze DJ, Karamagi C, Kiggundu M, Kanya MR, Wabwire-Mangen F, Kironde F, et al. Multiplicity of *Plasmodium falciparum* infection predicts antimalarial treatment outcome in Ugandan children. *Afr Health Sci.* 2008;8(4):200–5.
25. Wells TNC, Alonso PL, Gutteridge WE. New medicines to improve control and contribute to the eradication of malaria. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8(11):879–91.

26. Hänscheid T, Grobusch MP. How useful is PCR in the diagnosis of malaria? *Trends Parasitol.* 2002;18(9):395–8.
27. Moody A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clinical Microbiology Reviews.* 2002. p. 66–78.
28. Kain KC, Harrington MA, Tennyson S, Keystone JS. Imported malaria: prospective analysis of problems in diagnosis and management. *Clin Infect Dis.* 1998;27(1):142–9.
29. Payne D. Use and limitations of light microscopy for diagnosing malaria at the primary health care level. *Bull World Health Organ.* 1988;66(5):621–6.
30. Alves FP, Durlacher RUIR, Menezes MJ, Krieger H, Pereira LH, Camargo EP. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66(6):641–8.
31. Patsoula E, Spanakos G, Sofianatou D, Parara M, Vakalis NC. A single-step, PCR-based method for the detection and differentiation of *Plasmodium vivax* and *P. falciparum*. *Ann Trop Med Parasitol.* 2003;97(1):15–21.
32. de Monbrison F, Angei C, Staal A, Kaiser K, Picot S. Simultaneous identification of the four human *Plasmodium* species and quantification of *Plasmodium* DNA load in human blood by real-time polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2003;97(4):387–90.
33. Lee MA, Tan CH, Aw LT, Tang CS, Singh M, Lee SH, et al. Real-time fluorescence-based PCR for detection of malaria parasites. *J Clin Microbiol.* 2002;40(11):4343–5.
34. Tran TM, Aghili A, Li S, Ongoiba A, Kayentao K, Doumbo S, et al. A nested real-time PCR assay for the quantification of *Plasmodium falciparum* DNA extracted from dried blood spots. *Malar J.* 2014;13:393.
35. Mangold K a, Manson RU, Koay ESC, Stephens L, Regner M, Thomson RB, et al. Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium* spp. *J Clin Microbiol.* 2005;43(5):2435–40.

36. Orjuela-Sánchez P, da Silva NS, da Silva-Nunes M, Ferreira MU. Recurrent parasitemias and population dynamics of *Plasmodium vivax* polymorphisms in rural Amazonia. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81(6):961–8.
37. Battle KE, Karhunen MS, Bhatt S, Gething PW, Howes RE, Golding N, et al. Geographical variation in *Plasmodium vivax* relapse. *Malar J.* 2014;13(1):144.
38. White MT, Shirreff G, Karl S, Ghani AC, Mueller I, White MT. Variation in relapse frequency and the transmission potential of *Plasmodium vivax* malaria. *J R Soc Interface.* 2016;283(1827).
39. Ministerio de Salud. Norma Técnica de Salud para la atención de la Malaria y Malaria Grave en el Perú - NTS N° 054-MINSA/DGSP-V.01. 2007.
40. 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.* 2010;82(2):223–7.
41. Bødker R, Msangeni HA, Kisinza W, Lindsay SW. Relationship between the intensity of exposure to malaria parasites and infection in the Usambara Mountains, Tanzania. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;74(5):716–23.
42. Cheng Q, Cunningham J, Gatton ML. Systematic Review of Sub-microscopic *P. vivax* Infections: Prevalence and Determining Factors. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(1):e3413.
43. Mara SE, Silue KD, Raso G, N'guetta SP, N'goran EK, Tanner M, et al. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* among school-aged children. *Malar J.* 2013;12:419–28.
44. Moreira CM, Abo-Shehada M, Price RN, Drakeley CJ. A systematic review of sub-microscopic *Plasmodium vivax* infection. *Malar J.* 2015;14(1):360.
45. Rogier C, Commences D, Trape JF. Evidence for an age-dependent pyrogenic threshold of *Plasmodium falciparum* parasitemia in highly endemic

populations. *Am J Trop Med Hyg.* 1996;54(6):613–9.

46. Vallejo AF, García J, Amado-Garavito AB, Arévalo-Herrera M, Herrera S. *Plasmodium vivax* gametocyte infectivity in sub-microscopic infections. *Malar J.* 2016;15(1):48.
47. Snounou G, Viriyakosola S, Zhua XP, Jarraa W, Rosariob VE, Thaithongc S, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction higher sensitivity of detection of these four *Plasmodium*. *Mol Biochem Parasitol.* 1993;61:315–20.
48. Jelinek T, Proll S, Hess F, Kabagambe G, von Sonnenburg F, Loscher T, et al. Geographic differences in the sensitivity of a polymerase chain reaction for the detection of *Plasmodium falciparum* infection. *Am J Trop Med Hyg.* 1996;55(6):647–51.
49. Taylor SM, Juliano JJ, Trottman PA, Griffin JB, Landis SH, Kitsa P, et al. High-throughput pooling and real-time PCR-based strategy for malaria detection. *J Clin Microbiol.* 2010;48(2):512–9.
50. Beshir KB, Hallett RL, Eziefula AC, Bailey R, Watson J, Wright SG, et al. Measuring the efficacy of anti-malarial drugs in vivo: quantitative PCR measurement of parasite clearance. *Malar J.* 2010;9(1):312.
51. Yuan CC, Miley W, Waters D. A quantification of human cells using an ERV-3 real time PCR assay. *J Virol Methods.* 2001;91(2):109–17.
52. Jara M, Adai V, Valencia BM, Martinez D, Alba M, Castrillon C, et al. Real-time PCR assay for detection and quantification of *Leishmania* (*Viannia*) organisms in skin and mucosal lesions: exploratory study of parasite load and clinical parameters. *J Clin Microbiol.* 2013;51(6):1826–33.
53. Anderson TJ, Haubold B, Williams JT, Estrada-Franco JG, Richardson L, Mollinedo R, et al. Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol.* 2000;17(10):1467–82.
54. 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.

55. Karunaweera ND, Ferreira MU, Munasinghe A, Barnwell JW, Collins WE, King CL, et al. Extensive microsatellite diversity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Gene.* 2008;410(1):105–12.
56. Iwagami M, Fukumoto M, Hwang S-Y, Kim S-H, Kho W-G, Kano S. Population Structure and Transmission Dynamics of *Plasmodium vivax* in the Republic of Korea Based on Microsatellite DNA Analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(4):e1592.
57. Delgado-Ratto C, Soto-Calle VE, Van den Eede P, Gamboa D, Rosas A, Abatih EN, et al. Population structure and spatio-temporal transmission dynamics of *Plasmodium vivax* after radical cure treatment in a rural village of the Peruvian Amazon. *Malar J.* 2014;13:8.
58. Baniecki ML, Faust AL, Schaffner SF, Park DJ, Galinsky K, Daniels RF, et al. Development of a Single Nucleotide Polymorphism Barcode to Genotype *Plasmodium vivax* Infections. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(3):1–18.
59. Koepfli C, Ross A, Kiniboro B, Smith T a, Zimmerman P a, Siba P, et al. Multiplicity and diversity of *Plasmodium vivax* infections in a highly endemic region in Papua New Guinea. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(12):e1424.
60. Falk N, Maire N, Sama W, Owusu-Agyei S, Smith T, Beck HP, et al. Comparison of PCR-RFLP and genescan-based genotyping for analyzing infection dynamics of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;74(6):944–50.
61. Karunaweera ND, Ferreira MU, Hartl DL, Wirth DF. Fourteen polymorphic microsatellite DNA markers for the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Mol Ecol Notes.* 2006;7(1):172–5.
62. Leclerc MC, Durand P, Gauthier C, Patot S, Billotte N, Menegon M, et al. Meager genetic variability of the human malaria agent *Plasmodium vivax*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(40):14455–60.

63. Rezende AM, Tarazona-Santos E, Couto ADA, Fontes CJF, De Souza JM, Carvalho LH, et al. Analysis of genetic variability of *Plasmodium vivax* isolates from different Brazilian Amazon areas using tandem repeats. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;80(5):729–33.
64. Havryliuk T, Ferreira MU. A closer look at multiple-clone *Plasmodium vivax* infections: Detection methods, prevalence and consequences. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(1):67–73.
65. Gupta P, Singh R, Khan H, Raza A, Yadavendu V, Bhatt RM, et al. Genetic Profiling of the *Plasmodium falciparum* Population Using Antigenic Molecular Markers. *Sci World J.* 2014;2014:7.
66. Thomas M, Zervos, Jean N, Hernandez, Patrick L, Sutton and OHB. Quantification of *Plasmodium falciparum* malaria from complex infections in the Peruvian Amazon using quantitative PCR of the merozoite surface protein 1, block 2 (PfMSP1-B2): in vitro dynamics reveal density-dependent interactions. *Parasitology.* 2012;6(139):701–8.
67. Kidima W, Nkwengulila G. Multiplicity of Infections among Children under Five Years with Uncomplicated Malaria in Kibaha , Tanzania. *J Parasitol Res.* 2015;2015:6.
68. Bruce MC, Macheso A, McConnachie A, Molyneux ME. Comparative population structure of *Plasmodium malariae* and *Plasmodium falciparum* under different transmission settings in Malawi. *Malar J.* 2011;10(1):38.
69. Oyebola MK, Idowu ET, Olukosi Y a, Iwalokun B a, Agomo CO, Ajibaye OO, et al. Genetic diversity and complexity of *Plasmodium falciparum* infections in Lagos, Nigeria. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2014;4(Suppl 1):S87–91.
70. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics.* 2000;155(2):945–59.
71. Koepfli C, Rodrigues PT, Antao T, Orjuela-sánchez P, Eede P Van Den, Gamboa D, et al. *Plasmodium vivax* Diversity and Population Structure across Four Continents. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(6):1–23.

72. Wei G, Zhang L, Yan H, Zhao Y, Hu J, Pan W. Evaluation of the population structure and genetic diversity of *Plasmodium falciparum* in southern China. *Malar J.* 2015;14:283.
73. Liu Y, Auburn S, Cao J, Trimarsanto H, Zhou H, Gray K-A, et al. Genetic diversity and population structure of *Plasmodium vivax* in Central China. *Malar J.* 2014;13(1):262.
74. Delgado-Ratto C, Gamboa D, Soto-Calle VE, Van den Eede P, Torres E, Sánchez-Martínez L, et al. Population Genetics of *Plasmodium vivax* in the Peruvian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(1):e0004376.
75. Grietens KP, Soto V, Erhart A, Ribera JM, Toomer E, Tenorio A, et al. Adherence to 7-day primaquine treatment for the radical cure of *P. vivax* in the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;82(6):1017–23.
76. Smith J, Van De Kop P, Reategui K, Lombardi I, Sabogal C, Diaz A. Dynamics of secondary forests in slash-and-burn farming: Interactions among land use types in the Peruvian Amazon. *Agric Ecosyst Environ.* 1999;76(2-3):85–98.
77. Google Maps (2016). Mapa de las comunidades de Cahuide y San José de Lupuna, Iquitos - Perú en Google maps. 21 Junio, 2016 [Internet]. Available from: <https://www.google.com.pe/maps/@-3.885084,-73.2644864,11.42z>
78. Kamau E, Alemayehu S, Feghali KC, Saunders D, Ockenhouse CF. Multiplex qPCR for Detection and Absolute Quantification of Malaria. *PLoS One.* 2013;8(8).
79. Mckenzie FE, Prudhomme WA, Magill AJ, Forney JR, Lucas C, Jr RAG, et al. White Blood Cell Counts and Malaria. *J Infect Dis.* 2005;192(2):323–30.
80. WHO. Basic malaria microscopy: part I. learner's guide. World Health Organization. 2010. 88 p.
81. Gray K-A, Dowd S, Bain L, Bobogare A, Wini L, Shanks GD, et al. Population genetics of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* and asymptomatic malaria in Temotu Province, Solomon Islands. *Malar J.*

2013;12:429.

82. Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Mol Ecol*. 2005;14(8):2611–20.
83. 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.
84. Jakobsson M, Rosenberg NA. CLUMPP: A cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*. 2007;23(14):1801–6.
85. Rosenberg NA. DISTRUCT: A program for the graphical display of population structure. *Mol Ecol Notes*. 2004;4(1):137–8.
86. Paterson S, Lello J. Mixed models: Getting the best use of parasitological data. *Trends Parasitol*. 2003;19(8):370–5.
87. Chenet SM, Tapia LL, Escalante A a, Durand S, Lucas C, Bacon DJ. Genetic diversity and population structure of genes encoding vaccine candidate antigens of *Plasmodium vivax*. *Malar J*. 2012;11(1):68.
88. Nogueira PA, Nogueira PA, Pein O, Pein O, Santos R, Santos R, et al. A reduced risk of infection with *Plasmodium vivax* and clinical protection against malaria are associated with antibodies against the N terminus but not the C terminus of merozoite surface protein 1. *Society*. 2006;74(5):2726–33.
89. Cutts JC, Powell R, Agius P a, Beeson JG, Simpson J a, Fowkes FJI. Immunological markers of *Plasmodium vivax* exposure and immunity: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med*. 2014;12(1):150.
90. Kiwuwa MS, Ribacke U, Moll K, Byarugaba J, Lundblom K, Färnert A, et al. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* infections in mild and severe malaria of children from Kampala, Uganda. *Parasitol Res*. 2013;112(4):1691–700.

91. Galinsky K, Valim C, Salmier A, de Thoisy B, Musset L, Legrand E, et al. COIL: a methodology for evaluating malarial complexity of infection using likelihood from single nucleotide polymorphism data. *Malar J*. 2015;14:4.
92. Chuquiyauri R, Peñataro P, Brouwer KC, Fasabi M, Calderon M, Torres S, et al. Microgeographical differences of *Plasmodium vivax* relapse and re-infection in the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;89(2):326–38.
93. Baum E, Sattabongkot J, Sirichaisinthop J, Kiattibutr K, Davies DH, Jain A, et al. Submicroscopic and asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections are common in western Thailand - molecular and serological evidence. *Malar J*. 2015;14(1):95.
94. Imwong M, Boel ME, Pagornrat W, Pimanpanarak M, McGready R, Day NPJ, et al. The first *plasmodium vivax* relapses of life are usually genetically homologous. *J Infect Dis*. 2012;205(4):680–3.
95. de Araujo FCF, de Rezende AM, Fontes CJF, Carvalho LH, Alves de Brito CF. Multiple-clone activation of hypnozoites is the leading cause of relapse in *Plasmodium vivax* infection. *PLoS One*. 2012;7(11):e49871.

ANEXOS

ANEXO 1: BASE DE DATOS DE LABORATORIO CAHUIDE - 1

Cod. Ind.	Comunidad	Cod. muestra	F. muestra	Episodio	Ct qPCR 18S rRNA	Ct qPCR ERV-3	Parasitemia qPCR	MOI	Gota gruesa	Parasitemia GG
M1A001A	Cahuide	AC001081	11-oct-12	D0	24.43	27.50	14160.29	2.00	Positivo	1260
M1A001A	Cahuide	AC005731	12-mar-13	R1					Positivo	11700
M1A001A	Cahuide	AC012116	07-sep-13	R2	23.81	26.10	8765.56	1.00	Positivo	4950
M1A001A	Cahuide	AC015232	16-dic-13	R3	30.49	25.03	93.81	2.00	Positivo	48
M1A001A	Cahuide	AC017292	03-mar-14	R4	29.23	25.50	259.98	1.00	Positivo	360
M1A001G	Cahuide	AC005732	12-mar-13	D0					Positivo	2286
M1A001G	Cahuide	AC009388	20-jun-13	R1	25.10			1.00	Positivo	882
M1A005A	Cahuide	AC000654	24-sep-12	D0	28.97	26.20	459.56	1.00	Positivo	670
M1A005A	Cahuide	AC011557	02-sep-13	R1	29.37	25.62	256.45	1.00	Positivo	384
M1A005B	Cahuide	AC014845	05-dic-13	D0	30.97	27.40	294.54	1.00	Positivo	366
M1A005B	Cahuide	AC017483	05-mar-14	R1	25.21	24.03	1112.32	1.00	Positivo	2410
M1A007C	Cahuide	AC002216	03-dic-12	D0	27.03	29.97	13775.86	1.00	Positivo	4080
M1A007C	Cahuide	AC005947	15-mar-13	R1					Negativo	
M1A007C	Cahuide	AC008777	05-jun-13	R2	24.89	26.09	4651.90	2.00	Positivo	3141
M1A007C	Cahuide	AC017272	03-mar-14	R3	27.34	24.75	496.37	1.00	Positivo	912
M1A013A	Cahuide	AC000782	29-sep-12	D0	29.22	26.94	620.38	1.00	Negativo	
M1A013A	Cahuide	AC003052	19-dic-12	R1	33.73	26.49	34.20		Negativo	
M1A013A	Cahuide	AC011682	03-sep-13	R2	34.14	27.22	41.85		Negativo	
M1A019A	Cahuide	AC003117	21-dic-12	D0	34.41	27.90	53.70		Negativo	
M1A019A	Cahuide	AC015153	12-dic-13	R1	34.23	25.18	11.59		Negativo	
M1A023A	Cahuide	AC008540	03-jun-13	D0	29.95	25.96	224.91	2.00	Negativo	
M1A023A	Cahuide	AC017258	03-mar-14	R1	34.85	24.84	6.61		Negativo	
M1A032A	Cahuide	AC008598	04-jun-13	D0	33.01	29.82	384.24		Negativo	
M1A032A	Cahuide	AC011695	03-sep-13	R1	33.31	27.95	104.99		Negativo	
M1A036D	Cahuide	AC002565	10-dic-12	D0	22.87	26.38	17968.20	2.00	Positivo	11880
M1A036D	Cahuide	AC008607	04-jun-13	R1	26.20	26.77	3245.09	1.00	Positivo	2183
M1A040A	Cahuide	AC000404	15-sep-12	D0	29.61	25.52	209.82	2.00	Positivo	47
M1A040A	Cahuide	AC002728	12-dic-12	R1	31.27	27.67	291.43	1.00	Negativo	
M1A041B	Cahuide	AC011551	02-sep-13	D0	28.54	24.54	217.52	1.00	Positivo	108
M1A041B	Cahuide	AC014543	02-dic-13	R1	27.40	26.68	1527.71	1.00	Positivo	870
M1A046D	Cahuide	AC002371	05-dic-12	D0	29.35	26.92	569.76	1.00	Positivo	744
M1A046D	Cahuide	AC008782	05-jun-13	R1	33.12	26.01	36.63		Negativo	
M1A053A	Cahuide	AC000744	27-sep-12	D0	30.70	24.89	76.30	2.00	Negativo	
M1A053A	Cahuide	AC006064	20-mar-13	R1					Positivo	24
M1A056B	Cahuide	AC009039	11-jun-13	D0	30.48	24.59	72.43	1.00	Negativo	
M1A056B	Cahuide	AC012018	06-sep-13	R1	34.98	27.09	23.67		Negativo	
M1A059C	Cahuide	AC008963	10-jun-13	D0	30.11	23.80	55.84	1.00	Negativo	
M1A059C	Cahuide	AC011587	02-sep-13	R1	35.19				Negativo	
M1A064D	Cahuide	AC002436	06-dic-12	D0	34.84	28.18	49.44		Negativo	
M1A064D	Cahuide	AC009044	11-jun-13	R1	23.07	25.22	7923.00	1.00	Positivo	11402
M1A067D	Cahuide	AC015129	12-dic-13	D0	26.08	26.77	3485.89	1.00	Positivo	2046
M1A067D	Cahuide	AC017970	17-mar-14	R1	30.19	25.26	128.67	2.00	Positivo	84
M1A078A	Cahuide	AC003209	28-dic-12	D0	34.04	28.08	74.37		Negativo	
M1A078A	Cahuide	AC012435	18-sep-13	R1	29.25	27.21	718.61	3.00	Positivo	1836
M1A078A	Cahuide	AC014698	04-dic-13	R2	26.54	26.94	2959.47	1.00	Positivo	546

Cod. Ind. = Codigo de individuo

Cod. Muestra = Codigo de muestra

D0 = primer episodios; R1 = primera recurrencia; R2 = segunda recurrencia ; R3 = tercera recurrencia; R4 = cuarta recurrencia

Parasitemia GG = parasitemia por gota gruesa

ANEXO 2: BASE DE DATOS DE LABORATORIO CAHUIDE - 2

Cod. Ind.	Comunidad	Cod. muestra	F. muestra	Episodio	Ct qPCR 18S rRNA	Ct qPCR ERV-3	Parasitemia qPCR	MOI	Gota gruesa	Parasitemia GG
M1A080F	Cahuide	AC002502	07-dic-12	D0	33.94	27.22	47.01		Negativo	
M1A080F	Cahuide	AC017414	04-mar-14	R1	30.13	23.60	48.88	2.00	Positivo	24
M1A082B	Cahuide	AC000765	28-sep-12	D0	24.11	24.91	3584.90	2.00	Positivo	2646
M1A082B	Cahuide	AC008449	03-jun-13	R1	26.19	29.77	19834.63	1.00	Positivo	7980
M1A086A	Cahuide	AC006166	25-mar-13	D0					Negativo	
M1A086A	Cahuide	AC015256	16-dic-13	R1	33.22				Negativo	
M1A096A	Cahuide	AC000826	02-oct-12	D0	22.91	26.53	19211.70	1.00	Positivo	12240
M1A096A	Cahuide	AC008651	04-jun-13	R1	33.94	29.62	198.58		Negativo	
M1A102G	Cahuide	AC006224	26-mar-13	D0					Negativo	
M1A102G	Cahuide	AC018004	20-mar-14	R1	28.12			1.00	Positivo	810
M1A103A	Cahuide	AC000417	17-sep-12	D0	28.68	25.37	329.81	2.00	Positivo	120
M1A103A	Cahuide	AC008560	03-jun-13	R1	30.49	29.73	1587.54	2.00	Positivo	606
M1A113B	Cahuide	AC000424	17-sep-12	D0	28.14	25.67	543.86	1.00	Positivo	462
M1A113B	Cahuide	AC002314	04-dic-12	R1	35.39				Negativo	
M1A114C	Cahuide	AC002260	03-dic-12	D0	34.06				Negativo	
M1A114C	Cahuide	AC005974	18-mar-13	R1					Positivo	84
M1A115D	Cahuide	AC000490	18-sep-12	D0	30.24	24.33	71.30	2.00	Negativo	
M1A115D	Cahuide	AC008430	03-jun-13	R1	25.85	30.03	28376.99	1.00	Positivo	3930
M1A131A	Cahuide	AC000485	18-sep-12	D0	27.89	24.73	355.83	2.00	Positivo	432
M1A131A	Cahuide	AC002325	04-dic-12	R1	27.34	26.77	1678.17	1.00	Negativo	
M1A131A	Cahuide	AC015422	27-dic-13	R2	28.15	25.16	397.78	2.00	Positivo	24
M1A151B	Cahuide	AC000521	19-sep-12	D0	26.78	26.14	1593.62	2.00	Positivo	143
M1A151B	Cahuide	AC002861	14-dic-12	R1	33.06	29.02	231.84		Negativo	
M1A151B	Cahuide	AC009437	26-jun-13	R2	33.88	26.49	31.29		Negativo	
M1A156B	Cahuide	AC005792	13-mar-13	D0					Positivo	17
M1A156B	Cahuide	AC014739	04-dic-13	R1	25.15	26.11	4024.70	1.00	Positivo	2640
M1A156B	Cahuide	AC017985	18-mar-14	R2	33.10	25.96	35.92		Negativo	
M1B001E	Cahuide	AC002280	03-dic-12	D0	28.84			1.00	Positivo	390
M1B001E	Cahuide	AC005190	04-mar-13	R1					Positivo	3120
M1B007I	Cahuide	AC000114	10-sep-12	D0	32.92	26.98	73.75	1.00	Negativo	
M1B007I	Cahuide	AC002345	04-dic-12	R1	34.10	29.99	226.24		Negativo	
M1B007I	Cahuide	AC005930	14-mar-13	R2					Negativo	
M1B009B	Cahuide	AC002463	06-dic-12	D0	32.91	28.93	239.43	1.00	Negativo	
M1B009B	Cahuide	AC009369	20-jun-13	R1	21.39	24.83	16701.45	1.00	Positivo	2946
M1B011A	Cahuide	AC001161	19-oct-12	D0	26.99	28.13	4652.25	2.00	Positivo	510
M1B011A	Cahuide	AC003072	20-dic-12	R1	23.37	27.02	19714.95	1.00	Positivo	6360
M1B012B	Cahuide	AC003000	19-dic-12	D0	26.33	28.50	8527.58	2.00	Negativo	
M1B012B	Cahuide	AC005389	07-mar-13	R1					Positivo	420
M1B012B	Cahuide	AC012092	07-sep-13	R2	29.06	28.12	1381.86	1.00	Positivo	918
M1B016A	Cahuide	AC003175	26-dic-12	D0	28.51			1.00	Negativo	
M1B016A	Cahuide	AC005991	18-mar-13	R1					Positivo	5988
M1B016D	Cahuide	AC009254	17-jun-13	D0					Negativo	
M1B016D	Cahuide	AC015011	10-dic-13	R1	30.55			1.00	Positivo	96
M1B020B	Cahuide	AC000890	04-oct-12	D0	27.17	25.80	1029.04	2.00	Positivo	540
M1B020B	Cahuide	AC003197	28-dic-12	R1	34.80	27.82	40.66		Negativo	
M1B020B	Cahuide	AC005316	06-mar-13	R2					Positivo	576

Cod. Ind. = Codigo de individuo

Cod. Muestra = Codigo de muestra

D0 = primer episodios; R1 = primera recurrencia; R2 = segunda recurrencia ; R3 = tercera recurrencia; R4 = cuarta recurrencia

Parasitemia GG = parasitemia por gota gruesa

ANEXO 3: BASE DE DATOS DE LABORATORIO CAHUIDE - 3

Cod. Ind.	Comunidad	Cod. muestra	F. muestra	Episodio	Ct qPCR 18S rRNA	Ct qPCR ERV-3	Parasitemia qPCR	MOI	Gota gruesa	Parasitemia GG
M1B022A	Cahuide	AC001139	18-oct-12	D0	23.28	26.58	15960.31	1.00	Positivo	1590
M1B022A	Cahuide	AC002282	03-dic-12	R1	23.12	27.34	27541.92	1.00	Positivo	4830
M1B023B	Cahuide	AC000971	06-oct-12	D0	27.14	26.96	2112.28	2.00	Positivo	1080
M1B023B	Cahuide	AC008493	03-jun-13	R1	26.69	28.02	5192.35	1.00	Positivo	2808
M1B024B	Cahuide	AC003002	19-dic-12	D0	29.81	27.38	573.12	1.00	Negativo	
M1B024B	Cahuide	AC008936	07-jun-13	R1	27.71	25.15	510.97	1.00	Negativo	
M1B027A	Cahuide	AC000448	17-sep-12	D0	32.28	24.78	28.44	1.00	Negativo	
M1B027A	Cahuide	AC008908	07-jun-13	R1	30.84	25.60	107.66	1.00	Negativo	
M1B031E	Cahuide	AC000171	11-sep-12	D0	28.18	24.85	323.83	2.00	Positivo	94
M1B031E	Cahuide	AC009235	14-jun-13	R1	24.75	24.28	1698.30	1.00	Positivo	1446
M1B033D	Cahuide	AC000932	05-oct-12	D0	28.36	28.40	2466.19	1.00	Positivo	1385
M1B033D	Cahuide	AC005912	14-mar-13	R1					Negativo	
M1B033D	Cahuide	AC009194	14-jun-13	R2	32.27	25.04	33.39	2.00	Negativo	
M1B036A	Cahuide	AC001059	10-oct-12	D0	30.16	27.99	675.55	1.00	Negativo	
M1B036A	Cahuide	AC003152	26-dic-12	R1	25.32	27.87	10499.86	1.00	Positivo	450
M1B036B	Cahuide	AC002760	12-dic-12	D0	27.00	28.05	4410.81	1.00	Positivo	1740
M1B036B	Cahuide	AC005191	04-mar-13	R1					Negativo	
M1B037D	Cahuide	AC000406	16-sep-12	D0	25.35	25.83	3037.71	2.00	Positivo	3300
M1B037D	Cahuide	AC005696	11-mar-13	R1					Positivo	15692
M1B037D	Cahuide	AC008993	10-jun-13	R2	33.45	27.46	72.08		Negativo	
M1B043A	Cahuide	AC000405	15-sep-12	D0	24.03	25.56	5564.73	2.00	Positivo	894
M1B043A	Cahuide	AC014596	02-dic-13	R1	32.91	28.26	159.31	1.00	Negativo	
M1B043D	Cahuide	AC000724	27-sep-12	D0	23.57	26.08	9967.68	1.00	Positivo	1440
M1B043D	Cahuide	AC002414	05-dic-12	R1	26.50	26.96	3061.03	1.00	Positivo	1710
M1B043D	Cahuide	AC006254	27-mar-13	R2					Positivo	1740
M1B047D	Cahuide	AC006101	21-mar-13	D0					Positivo	654
M1B047D	Cahuide	AC009151	13-jun-13	R1	28.57			1.00	Positivo	300
M1B048A	Cahuide	AC001137	18-oct-12	D0	25.75	27.74	7571.48	1.00	Positivo	307
M1B048A	Cahuide	AC002793	13-dic-12	R1	33.54	26.68	42.87		Negativo	
M1B048A	Cahuide	AC009097	11-jun-13	R2	33.21	27.98	113.54		Negativo	
M1F031B	Cahuide	AC005857	13-mar-13	D0					Negativo	
M1F031B	Cahuide	AC006126	22-mar-13	R1					Positivo	360
M1F031B	Cahuide	AC011952	06-sep-13	R2	28.20			1.00	Positivo	1530
M1F031D	Cahuide	AC012396	13-sep-13	D0	30.35	29.24	1281.09	1.00	Positivo	96
M1F031D	Cahuide	AC014910	07-dic-13	R1	25.12	27.22	8022.55	1.00	Positivo	6360
M1F031D	Cahuide	AC017620	06-mar-14	R2	31.20	28.18	413.55	1.00	Negativo	
M1F044A	Cahuide	AC006004	18-mar-13	D0					Positivo	6366
M1F044A	Cahuide	AC012190	09-sep-13	R1	27.06			1.00	Positivo	1386
M1F044C	Cahuide	AC008635	04-jun-13	D0	27.12			1.00	Negativo	
M1F044C	Cahuide	AC017707	07-mar-14	R1	38.21				Negativo	

Cod. Ind. = Codigo de individuo

Cod. Muestra = Codigo de muestra

D0 = primer episodios; R1 = primera recurrencia; R2 = segunda recurrencia ; R3 = tercera recurrencia; R4 = cuarta recurrencia

Parasitemia GG = parasitemia por gota gruesa

ANEXO 4: BASE DE DATOS EPIDEMIOLOGICOS CAHUIDE - 1

Cod. Ind.	Comunidad	Cod. muestra	Episodio	Edad	Género	Tratamiento	Medicamento	Fiebre	Escalofrios	Dolor de cabeza	Tiempo Comunidad	Malaria Viv en su vida	Malaria Viv ultimo año	Viaje ultimo mes +10Km
M1A001A	Cahuide	AC001081	D0	30	F	1	C + P	1	1	1	9 años	1 vez	1 vez	0
M1A001A	Cahuide	AC005731	R1	30	F	1	C + P	2	2	1	9 años	1 vez	1 vez	0
M1A001A	Cahuide	AC012116	R2	30	F	1	C + P	2	2	1	9 años	1 vez	1 vez	0
M1A001A	Cahuide	AC015232	R3	30	F	1	C + P	2	2	2	9 años	1 vez	1 vez	0
M1A001A	Cahuide	AC017292	R4	30	F	1	C + P	2	2	1	9 años	1 vez	1 vez	0
M1A001G	Cahuide	AC005732	D0	15	M	1	C + P	2	2	1	6 años	0	0	0
M1A001G	Cahuide	AC009388	R1	15	M	1	C + P	1	1	1	6 años	0	0	0
M1A005A	Cahuide	AC000654	D0	39	M	1	C + P	2	2	2	10 años	6 veces	2 veces	0
M1A005A	Cahuide	AC011557	R1	39	M	1	C + P	2	2	2	10 años	6 veces	2 veces	0
M1A005B	Cahuide	AC014845	D0	35	F	1	C + P	2	2	2	10 años	2 veces	1 vez	0
M1A005B	Cahuide	AC017483	R1	35	F	1	C + P	2	2	2	10 años	2 veces	1 vez	0
M1A007C	Cahuide	AC002216	D0	14	M	1	C + P	2	2	2	12 años	1 vez	1 vez	0
M1A007C	Cahuide	AC005947	R1	14	M	2		1	1	2	12 años	1 vez	1 vez	0
M1A007C	Cahuide	AC008777	R2	14	M	1	C + P	2	2	2	12 años	1 vez	1 vez	0
M1A007C	Cahuide	AC017272	R3	14	M	1	C + P	2	2	2	12 años	1 vez	1 vez	0
M1A013A	Cahuide	AC000782	D0	26	M	2		2	2	2	7 años	1 vez	1 vez	0
M1A013A	Cahuide	AC003052	R1	26	M	2		2	2	2	7 años	1 vez	1 vez	0
M1A013A	Cahuide	AC011682	R2	26	M	2		2	2	2	7 años	1 vez	1 vez	0
M1A019A	Cahuide	AC003117	D0	38	M	2		2	2	2	3 años	1 vez	1 vez	0
M1A019A	Cahuide	AC015153	R1	38	M	2		2	2	2	3 años	1 vez	1 vez	0
M1A023A	Cahuide	AC008540	D0	33	M	2		2	2	2	9 años	1 vez	0	0
M1A023A	Cahuide	AC017258	R1	33	M	2		2	2	2	9 años	1 vez	0	0
M1A032A	Cahuide	AC008598	D0	52	M	2		2	2	2	2 años	1 vez	1 vez	1 vez
M1A032A	Cahuide	AC011695	R1	52	M	2		2	2	2	2 años	1 vez	1 vez	1 vez
M1A036D	Cahuide	AC002565	D0	25	M	1	C + P	1	1	2	1 año	2 veces	0	1 vez
M1A036D	Cahuide	AC008607	R1	25	M	1	C + P	2	2	2	1 año	2 veces	0	1 vez
M1A040A	Cahuide	AC000404	D0	47	M	1	C + P	2	2	2	3 años	2 veces	1 vez	0
M1A040A	Cahuide	AC002728	R1	47	M	2		2	2	2	3 años	2 veces	1 vez	0
M1A041B	Cahuide	AC011551	D0	33	F	1	C + P	2	1	1	1 año	7 veces	5 veces	0
M1A041B	Cahuide	AC014543	R1	33	F	1	C + P	2	2	1	1 año	7 veces	5 veces	0
M1A046D	Cahuide	AC002371	D0	15	F	1	C + P	2	2	2	6 meses	1 vez	1 vez	0
M1A046D	Cahuide	AC008782	R1	15	F	2		2	2	2	6 meses	1 vez	1 vez	0
M1A053A	Cahuide	AC000744	D0	35	M	2		2	2	2	8 años	2 veces	0	1 vez
M1A053A	Cahuide	AC006064	R1	35	M	1	C + P	2	2	2	8 años	2 veces	0	1 vez
M1A056B	Cahuide	AC009039	D0	43	M	2		2	2	2	11 años	0	0	0
M1A056B	Cahuide	AC012018	R1	43	M	2		2	2	2	11 años	0	0	0
M1A059C	Cahuide	AC008963	D0	25	M	2		2	2	2	25 años	1 vez	1 vez	0
M1A059C	Cahuide	AC011587	R1	25	M	2		2	2	2	25 años	1 vez	1 vez	0
M1A064D	Cahuide	AC002436	D0	14	F	2		2	2	2	14 años	0	0	0
M1A064D	Cahuide	AC009044	R1	14	F	1	C + P	2	1	1	14 años	0	0	0
M1A067D	Cahuide	AC015129	D0	12	M	1	C + P	2	2	2	3 años	3 veces	1 vez	0
M1A067D	Cahuide	AC017970	R1	12	M	1	C + P	1	2	1	3 años	3 veces	1 vez	0
M1A078A	Cahuide	AC003209	D0	6	F	2		1	2	1	12 años	2 veces	1 vez	0
M1A078A	Cahuide	AC012435	R1	64	M	1	C + P	2	2	2	12 años	2 veces	1 vez	0
M1A078A	Cahuide	AC014698	R2	64	M	1	C + P	1	1	2	12 años	2 veces	1 vez	0

M = Masculino ; F = Femenino

1 = Sí ; 2 = No

77 = no aplica

C + P = Cloroquina + Primaquina

ANEXO 5: BASE DE DATOS EPIDEMIOLOGICOS CAHUIDE – 2

Cod. Ind.	Comunidad	Cod. muestra	Episodio	Edad	Género	Tratamiento	Medicamento	Fiebre	Escalofrios	Dolor de cabeza	Tiempo Comunidad	Malaria Viv en su vida	Malaria Viv ultimo año	Viaje ultimo mes +10Km
M1A080F	Cahuide	AC002502	D0	12	F	2		2	2	2	3 años	0	0	0
M1A080F	Cahuide	AC017414	R1	12	F	1	C + P	2	2	1	3 años	0	0	0
M1A082B	Cahuide	AC000765	D0	43	F	1	C + P	1	1	1	2 años	5 veces	5 veces	0
M1A082B	Cahuide	AC008449	R1	43	F	1	C + P	1	1	1	2 años	5 veces	5 veces	0
M1A086A	Cahuide	AC006166	D0	42	M	2		2	2	2	42 años	1 vez	0	0
M1A086A	Cahuide	AC015256	R1	42	M	2		2	2	2	42 años	1 vez	0	0
M1A096A	Cahuide	AC000826	D0	60	F	1	C + P	1	1	1	60 años	0	0	0
M1A096A	Cahuide	AC008651	R1	60	F	2		2	2	2	60 años	0	0	0
M1A102G	Cahuide	AC006224	D0	10	M	2		2	2	2	10 años	1 vez	0	0
M1A102G	Cahuide	AC018004	R1	10	M	1	C + P	2	2	2	10 años	1 vez	0	0
M1A103A	Cahuide	AC000417	D0	67	M	1	C + P	2	2	2	67 años	1 vez	0	0
M1A103A	Cahuide	AC008560	R1	67	M	1	C + P	2	2	2	67 años	1 vez	0	0
M1A113B	Cahuide	AC000424	D0	19	F	1	C + P	2	2	2	5 años	3 veces	0	0
M1A113B	Cahuide	AC002314	R1	19	F	2		2	2	2	5 años	3 veces	0	0
M1A114C	Cahuide	AC002260	D0	52	M	2		2	2	2	3 años	23 veces	2 veces	0
M1A114C	Cahuide	AC005974	R1	52	M	1	C + P	2	2	2	3 años	23 veces	2 veces	0
M1A115D	Cahuide	AC000490	D0	8	M	2		2	2	2	1 año	0	0	0
M1A115D	Cahuide	AC008430	R1	8	M	1	C + P	2	1	1	1 año	0	0	0
M1A131A	Cahuide	AC000485	D0	29	M	1	C + P	2	2	2	7 años	4 veces	2 veces	0
M1A131A	Cahuide	AC002325	R1	29	M	2		2	2	1	7 años	4 veces	2 veces	0
M1A131A	Cahuide	AC015422	R2	29	M	1	C + P	2	2	2	7 años	4 veces	2 veces	0
M1A151B	Cahuide	AC000521	D0	31	F	1	C + P	2	2	2	2 años	2 veces	1 vez	0
M1A151B	Cahuide	AC002861	R1	31	F	2		2	2	2	2 años	2 veces	1 vez	0
M1A151B	Cahuide	AC009437	R2	31	F	2		2	2	2	2 años	2 veces	1 vez	0
M1A156B	Cahuide	AC005792	D0	21	M	1	C + P	2	2	1	1 mes	1 vez	0	0
M1A156B	Cahuide	AC014739	R1	21	M	1	C + P	1	1	1	1 mes	1 vez	0	0
M1A156B	Cahuide	AC017985	R2	21	M	2		2	2	2	1 mes	1 vez	0	0
M1B001E	Cahuide	AC002280	D0	14	M	1	C + P	1	1	2	13 años	1 vez	0	0
M1B001E	Cahuide	AC005190	R1	14	M	1	C + P	1	2	1	13 años	1 vez	0	0
M1B007I	Cahuide	AC000114	D0	30	M	2		2	2	2	2 meses	1 vez	0	0
M1B007I	Cahuide	AC002345	R1	30	M	2		2	2	1	2 meses	1 vez	0	0
M1B007I	Cahuide	AC005930	R2	30	M	2		2	2	2	2 meses	1 vez	0	0
M1B009B	Cahuide	AC002463	D0	66	F	2		2	2	2	22 años	7 veces	0	0
M1B009B	Cahuide	AC009369	R1	66	F	1	C + P	1	1	1	22 años	7 veces	0	0
M1B011A	Cahuide	AC001161	D0	51	M	1	C + P	2	2	2	30 años	2 veces	0	0
M1B011A	Cahuide	AC003072	R1	51	M	1	C + P	1	1	1	30 años	2 veces	0	0
M1B012B	Cahuide	AC003000	D0	22	F	2		2	2	2	8 años	2 veces	2 veces	0
M1B012B	Cahuide	AC005389	R1	22	F	1	C + P	2	2	1	8 años	2 veces	2 veces	0
M1B012B	Cahuide	AC012092	R2	22	F	1	C + P	2	2	2	8 años	2 veces	2 veces	0
M1B016A	Cahuide	AC003175	D0	28	M	2		2	2	2	5 años	6 veces	0	0
M1B016A	Cahuide	AC005991	R1	28	M	1	C + P	1	1	1	5 años	6 veces	0	0
M1B016D	Cahuide	AC009254	D0	14	F	2		2	2	1	1 año	0	0	0
M1B016D	Cahuide	AC015011	R1	14	F	1	C + P	1	2	1	1 año	0	0	0
M1B020B	Cahuide	AC000890	D0	37	F	1	C + P	2	1	1	20 años	5 veces	2 veces	0
M1B020B	Cahuide	AC003197	R1	14	F	2		2	2	2	20 años	5 veces	2 veces	0
M1B020B	Cahuide	AC005316	R2	37	F	1	C + P	2	2	2	20 años	5 veces	2 veces	0

M = Masculino ; F = Femenino

1 = Sí ; 2 = No

77 = no aplica

C + P = Cloroquina + Primaquina

ANEXO 6: BASE DE DATOS EPIDEMIOLOGICOS CAHUIDE – 3

Cod. Ind.	Comunidad	Cod. muestra	Episodio	Edad	Género	Tratamiento	Medicamento	Fiebre	Escalofrios	Dolor de cabeza	Tiempo Comunidad	Malaria Viv en su vida	Malaria Viv ultimo año	Viaje ultimo mes +10Km
M1B022A	Cahuide	AC001139	D0	32	M	1	C + P	1	1	1	13 años	2 veces	1 vez	0
M1B022A	Cahuide	AC002282	R1	32	M	1	C + P	1	2	1	13 años	2 veces	1 vez	0
M1B023B	Cahuide	AC000971	D0	49	F	1	C + P	1	1	1	12 años	4 veces	1 vez	0
M1B023B	Cahuide	AC008493	R1	49	F	1	C + P	1	2	1	12 años	4 veces	1 vez	0
M1B024B	Cahuide	AC003002	D0	35	F	2		2	2	2	15 años	2 veces	1 vez	0
M1B024B	Cahuide	AC008936	R1	35	F	2		2	2	2	15 años	2 veces	1 vez	0
M1B027A	Cahuide	AC000448	D0	49	M	2		2	2	2	11 años	1 vez	0	0
M1B027A	Cahuide	AC008908	R1	49	M	2		2	2	2	11 años	1 vez	0	0
M1B031E	Cahuide	AC000171	D0	44	F	1	C + P	2	2	2	44 años	2 veces	1 vez	0
M1B031E	Cahuide	AC009235	R1	44	F	1	C + P	1	1	2	44 años	2 veces	1 vez	0
M1B033D	Cahuide	AC000932	D0	24	M	1	C + P	2	2	2	1 año	1 vez	1 vez	0
M1B033D	Cahuide	AC005912	R1	24	M	2		2	2	2	1 año	1 vez	1 vez	0
M1B033D	Cahuide	AC009194	R2	24	M	2		2	2	2	1 año	1 vez	1 vez	0
M1B036A	Cahuide	AC001059	D0	48	M	2		1	2	2	16 años	5 veces	2 veces	0
M1B036A	Cahuide	AC003152	R1	48	M	1	C + P	2	2	2	16 años	5 veces	2 veces	0
M1B036B	Cahuide	AC002760	D0	48	F	1	C + P	1	2	1	16 años	4 veces	1 vez	0
M1B036B	Cahuide	AC005191	R1	48	F	2		1	2	1	16 años	4 veces	1 vez	0
M1B037D	Cahuide	AC000406	D0	16	M	1	C + P	1	2	1	16 años	0	0	0
M1B037D	Cahuide	AC005696	R1	16	M	1	C + P	1	1	1	16 años	0	0	0
M1B037D	Cahuide	AC008993	R2	16	M	2		2	2	2	16 años	0	0	0
M1B043A	Cahuide	AC000405	D0	53	M	1	C + P	1	2	1	17 años	2 veces	1 vez	0
M1B043A	Cahuide	AC014596	R1	53	M	2		2	2	1	17 años	2 veces	1 vez	0
M1B043D	Cahuide	AC000724	D0	15	F	1	C + P	1	1	1	15 años	1 vez	1 vez	0
M1B043D	Cahuide	AC002414	R1	15	F	1	C + P	1	1	2	15 años	1 vez	1 vez	0
M1B043D	Cahuide	AC006254	R2	15	F	1	C + P	2	1	1	15 años	1 vez	1 vez	0
M1B047D	Cahuide	AC006101	D0	5	F	1	C + P	2	2	2	3 años	0	0	0
M1B047D	Cahuide	AC009151	R1	5	F	1	C + P	2	2	2	3 años	0	0	0
M1B048A	Cahuide	AC001137	D0	28	M	1	C + P	1	1	1	2 años	5 veces	2 veces	0
M1B048A	Cahuide	AC002793	R1	28	M	2		2	2	2	2 años	5 veces	2 veces	0
M1B048A	Cahuide	AC009097	R2	28	M	2		2	2	2	2 años	5 veces	2 veces	0
M1F031B	Cahuide	AC005857	D0	37	F	2		2	2	2	7 años	3 veces	2 veces	0
M1F031B	Cahuide	AC006126	R1	37	F	1	C + P	2	2	2	7 años	3 veces	2 veces	0
M1F031B	Cahuide	AC011952	R2	37	F	1	C + P	2	2	1	7 años	3 veces	2 veces	0
M1F031D	Cahuide	AC012396	D0	10	F	1	C + P	2	1	2	7 años	0	0	0
M1F031D	Cahuide	AC014910	R1	10	F	1	C + P	1	2	1	7 años	0	0	0
M1F031D	Cahuide	AC017620	R2	10	F	2		2	2	2	7 años	0	0	0
M1F044A	Cahuide	AC006004	D0	67	M	1	C + P	1	2	1	16 años	0	0	0
M1F044A	Cahuide	AC012190	R1	67	M	1	C + P	2	2	1	16 años	0	0	0
M1F044C	Cahuide	AC008635	D0	44	F	2		2	1	2	16 años	1 vez	0	0
M1F044C	Cahuide	AC017707	R1	44	F	2		2	2	2	16 años	1 vez	0	0

M = Masculino ; F = Femenino

1 = Sí ; 2 = No

77 = no aplica

C + P = Cloroquina + Primaquina

ANEXO 7: BASE DE DATOS DE LABORATORIO LUPUNA – 1

Cod. Ind.	Comunidad	Cod. muestra	F. muestra	Episodio	Ct qPCR 18S rRNA	Ct qPCR ERV-3	Parasitemia qPCR	MOI	Gota gruesa	Parasitemia GG
M1C001D	Lupuna	AL010106	02-sep-13	D0	25.28	27.42	8238	1.00	Positivo	1134
M1C001D	Lupuna	AL016291	25-mar-14	R1	28.66	25.77	426	2.00	Positivo	360
M1C001I	Lupuna	AL007500	04-jun-13	D0	38.43				Negativo	
M1C001I	Lupuna	AL015555	04-mar-14	R1	23.30			1.00	Positivo	3572
M1C003D	Lupuna	AL005382	31-mar-13	D0	29.23	26.02	355	1.00	Positivo	84
M1C003D	Lupuna	AL013639	19-dic-13	R1	32.68	24.34	17	1.00	Negativo	
M1C008C	Lupuna	AL007337	03-jun-13	D0	29.48	26.54	418	1.00	Positivo	660
M1C008C	Lupuna	AL013365	09-dic-13	R1	30.54	27.91	516	1.00	Positivo	12
M1C009A	Lupuna	AL005084	13-mar-13	D0	40.31				Negativo	
M1C009A	Lupuna	AL015689	05-mar-14	R1	35.28				Negativo	
M1C015A	Lupuna	AL013368	09-dic-13	D0	33.20	26.95	61		Negativo	
M1C015A	Lupuna	AL016250	20-mar-14	R1	35.15				Negativo	
M1C017B	Lupuna	AL005358	26-mar-13	D0	26.64				Positivo	2790
M1C017B	Lupuna	AL007832	10-jun-13	R1	36.07				Positivo	36
M1C024B	Lupuna	AL005374	27-mar-13	D0	29.82				Positivo	36
M1C024B	Lupuna	AL010654	09-sep-13	R1	36.21				Negativo	
M1C031G	Lupuna	AL005214	18-mar-13	D0					Negativo	
M1C031G	Lupuna	AL007910	11-jun-13	R1	37.84				Negativo	
M1C037A	Lupuna	AL004610	06-mar-13	D0					Negativo	
M1C037A	Lupuna	AL005301	21-mar-13	R1	37.28				Negativo	
M1C063C	Lupuna	AL000330	14-ago-12	D0	22.26	25.14	12112	1.00	Positivo	4849
M1C063C	Lupuna	AL005294	21-mar-13	R1	30.78	32.36	6515	1.00	Positivo	696
M1C063D	Lupuna	AL005241	19-mar-13	D0					Positivo	48
M1C063D	Lupuna	AL007478	04-jun-13	R1	28.01	25.05	404	2.00	Positivo	600
M1C063D	Lupuna	AL010982	25-sep-13	R2	30.36	25.15	109	1.00	Positivo	2580
M1C069B	Lupuna	AL005321	22-mar-13	D0	29.03	28.26	1535	1.00	Negativo	
M1C069B	Lupuna	AL007849	10-jun-13	R1	33.48	30.53	448		Positivo	2340
M1C069C	Lupuna	AL007915	11-jun-13	D0	25.03	26.58	5733	1.00	Positivo	2100
M1C069C	Lupuna	AL015615	04-mar-14	R1	30.25	26.34	238	1.00	Positivo	384
M1C073E	Lupuna	AL010184	02-sep-13	D0	28.07	27.84	2078	2.00	Positivo	2424
M1C073E	Lupuna	AL012945	03-dic-13	R1	31.33	27.17	208	1.00	Positivo	24
M1C073E	Lupuna	AL015712	05-mar-14	R2	29.57	26.28	340	1.00	Positivo	1074
M1C084D	Lupuna	AL013386	09-dic-13	D0	28.15	28.65	3238	1.00	Negativo	
M1C084D	Lupuna	AL015620	04-mar-14	R1	26.69	26.21	1748	1.00	Positivo	1224
M1C088A	Lupuna	AL013387	09-dic-13	D0	27.01				Negativo	
M1C088A	Lupuna	AL016135	13-mar-14	R1	35.29				Negativo	
M1C107D	Lupuna	AL005193	15-mar-13	D0					Negativo	
M1C107D	Lupuna	AL010793	11-sep-13	R1	35.50				Negativo	
M1D001B	Lupuna	AL004995	12-mar-13	D0					Negativo	
M1D001B	Lupuna	AL007951	12-jun-13	R1	32.77				Negativo	
M1D002C	Lupuna	AL005349	25-mar-13	D0	27.08	28.86	6833	1.00	Positivo	810
M1D002C	Lupuna	AL016315	27-mar-14	R1	23.60	27.03	17344	1.00	Positivo	5910
M1D003A	Lupuna	AL010702	10-sep-13	D0	34.32				Negativo	
M1D003A	Lupuna	AL013540	12-dic-13	R1	36.53				Negativo	
M1D008B	Lupuna	AL005386	31-mar-13	D0	25.30	28.09	12180	1.00	Positivo	1536
M1D008B	Lupuna	AL010987	27-sep-13	R1	33.11	26.60	52		Positivo	312
M1D008B	Lupuna	AL015885	07-mar-14	R2	25.73	29.65	24242	1.00	Positivo	3720
M1D010E	Lupuna	AL005068	13-mar-13	D0					Positivo	12
M1D010E	Lupuna	AL010938	18-sep-13	R1	42.56				Negativo	

Cod. Ind. = Codigo de individuo

Cod. Muestra = Codigo de muestra

D0 = primer episodios; R1 = primera recurrencia; R2 = segunda recurrencia ; R3 = tercera recurrencia; R4 = cuarta recurrencia

Parasitemia GG = parasitemia por gota gruesa

ANEXO 8: BASE DE DATOS DE LABORATORIO LUPUNA – 2

Cod. Ind.	Comunidad	Cod. muestra	F. muestra	Episodio	Ct qPCR 18S rRNA	Ct qPCR ERV-3	Parasitemia qPCR	MOI	Gota gruesa	Parasitemia GG
M1D013A	Lupuna	AL004929	11-mar-13	D0					Negativo	
M1D013A	Lupuna	AL013513	12-dic-13	R1	33.47	26.76	47		Negativo	
M1D019A	Lupuna	AL001917	04-dic-12	D0	34.44	26.29	20		Negativo	
M1D019A	Lupuna	AL016005	11-mar-14	R1	31.91	27.01	135	1.00	Positivo	612
M1D019C	Lupuna	AL007684	07-jun-13	D0	32.12	29.16	435	1.00	Positivo	24
M1D019C	Lupuna	AL010203	03-sep-13	R1	30.41	27.96	571	1.00	Positivo	1950
M1D019D	Lupuna	AL005010	12-mar-13	D0					Positivo	12
M1D019D	Lupuna	AL008109	14-jun-13	R1	24.22				Positivo	2976
M1D020C	Lupuna	AL010704	10-sep-13	D0	28.15	32.04	24795	1.00	Positivo	3750
M1D020C	Lupuna	AL015951	10-mar-14	R1	32.12	29.99	716	1.00	Positivo	420
M1D024A	Lupuna	AL007890	11-jun-13	D0	31.06			1.00	Negativo	
M1D024A	Lupuna	AL010501	06-sep-13	R1	34.90				Negativo	
M1D024B	Lupuna	AL007333	03-jun-13	D0	29.22	27.40	820	2.00	Negativo	
M1D024B	Lupuna	AL010619	09-sep-13	R1	26.65	29.67	14294	1.00	Positivo	4248
M1D025I	Lupuna	AL005168	15-mar-13	D0					Positivo	546
M1D025I	Lupuna	AL007893	11-jun-13	R1	29.10			1.00	Positivo	2196
M1D025I	Lupuna	AL013484	11-dic-13	R2	35.19				Positivo	10410
M1D026C	Lupuna	AL002610	20-dic-12	D0	30.53	28.00	547	2.00	Positivo	6965
M1D026C	Lupuna	AL007692	07-jun-13	R1	30.61	28.79	838	1.00	Positivo	24
M1D026F	Lupuna	AL008114	14-jun-13	D0	25.35			1.00	Positivo	870
M1D026F	Lupuna	AL013341	09-dic-13	R1	34.15				Positivo	24
M1D031A	Lupuna	AL002672	28-dic-12	D0	34.67	27.96	48		Negativo	
M1D031A	Lupuna	AL010845	13-sep-13	R1	32.47	29.49	433		Negativo	
M1D041F	Lupuna	AL002643	26-dic-12	D0	36.81				Negativo	
M1D041F	Lupuna	AL008257	25-jun-13	R1	25.91			1.00	Positivo	5880
M1D042A	Lupuna	AL004937	11-mar-13	D0					Negativo	
M1D042A	Lupuna	AL015434	03-mar-14	R1	35.26				Negativo	
M1D042D	Lupuna	AL005352	25-mar-13	D0	26.07	27.31	4865	1.00	Positivo	726
M1D042D	Lupuna	AL010965	23-sep-13	R1	32.37	27.72	158	1.00	Negativo	
M1D042D	Lupuna	AL015437	03-mar-14	R2	28.52	26.75	832	2.00	Positivo	486
M1D044B	Lupuna	AL008119	14-jun-13	D0	30.24	25.60	153	1.00	Negativo	
M1D044B	Lupuna	AL016012	11-mar-14	R1	32.91	27.83	124	1.00	Negativo	
M1D050C	Lupuna	AL007975	12-jun-13	D0	33.02	27.04	72		Negativo	
M1D050C	Lupuna	AL015455	03-mar-14	R1	31.64	25.41	60	1.00	Negativo	
M1D051G	Lupuna	AL000624	07-sep-12	D0	27.42	25.82	902	1.00	Positivo	600
M1D051G	Lupuna	AL015801	06-mar-14	R1	26.75	28.01	4987	2.00	Positivo	1116
M1D052C	Lupuna	AL010948	19-sep-13	D0	32.38	25.50	41	1.00	Positivo	24
M1D052C	Lupuna	AL015963	10-mar-14	R1	34.29	26.64	27		Positivo	24
M1D052E	Lupuna	AL005208	18-mar-13	D0					Positivo	1086
M1D052E	Lupuna	AL010537	06-sep-13	R1	33.58	29.03	172		Negativo	
M1D052E	Lupuna	AL015802	07-mar-14	R2					Negativo	
M1D054C	Lupuna	AL007737	07-jun-13	D0	27.33	29.11	6881	1.00	Positivo	5190
M1D054C	Lupuna	AL015804	07-mar-14	R1	28.04	28.38	2933	1.00	Positivo	4170
M1D056E	Lupuna	AL007430	04-jun-13	D0	25.91	27.34	5440	1.00	Positivo	6960
M1D056E	Lupuna	AL015966	10-mar-14	R1	33.43	25.95	29		Negativo	
M1E001C	Lupuna	AL002028	05-dic-12	D0	30.20			1.00	Positivo	1206
M1E001C	Lupuna	AL004651	07-mar-13	R1					Negativo	
M1E005D	Lupuna	AL000505	27-ago-12	D0					Positivo	600
M1E005D	Lupuna	AL001891	03-dic-12	R1	35.05				Negativo	
M1E005D	Lupuna	AL004890	11-mar-13	R2					Negativo	
M1E005D	Lupuna	AL010677	10-sep-13	R3	40.58				Negativo	

Cod. Ind. = Codigo de individuo

Cod. Muestra = Codigo de muestra

D0 = primer episodios; R1 = primera recurrencia; R2 = segunda recurrencia ; R3 = tercera recurrencia; R4 = cuarta recurrencia

Parasitemia GG = parasitemia por gota gruesa

ANEXO 9: BASE DE DATOS DE LABORATORIO LUPUNA – 3

Cod. Ind.	Comunidad	Cod. muestra	F. muestra	Episodio	Ct qPCR 18S rRNA	Ct qPCR ERV-3	Parasitemia qPCR	MOI	Gota gruesa	Parasitemia GG
M1E013F	Lupuna	AL000017	09-ago-12	D0	27.27	26.02	1113	1.00	Positivo	330
M1E013F	Lupuna	AL007523	05-jun-13	R1	31.35	26.17	113	1.00	Positivo	24
M1E018A	Lupuna	AL002044	05-dic-12	D0					Negativo	
M1E018A	Lupuna	AL008083	14-jun-13	R1	32.69			1.00	Negativo	
M1E020D	Lupuna	AL007872	11-jun-13	D0	35.26				Positivo	24
M1E020D	Lupuna	AL010966	23-sep-13	R1	27.34			1.00	Positivo	2574
M1E024A	Lupuna	AL008124	17-jun-13	D0	28.54	24.86	264	2.00	Negativo	
M1E024A	Lupuna	AL010852	16-sep-13	R1	29.54	27.25	621	1.00	Negativo	
M1E024A	Lupuna	AL015650	05-mar-14	R2	33.09	27.66	101		Negativo	
M1E026A	Lupuna	AL007534	05-jun-13	D0	32.92	26.99	74	1.00	Positivo	36
M1E026A	Lupuna	AL010564	09-sep-13	R1	31.30	28.24	403	1.00	Positivo	324
M1E027A	Lupuna	AL002057	05-dic-12	D0					Negativo	
M1E027A	Lupuna	AL008247	25-jun-13	R1	27.35			1.00	Positivo	2190
M1E028C	Lupuna	AL010442	05-sep-13	D0	33.74	25.42	18		Negativo	
M1E028C	Lupuna	AL016146	14-mar-14	R1	30.08	25.06	121	1.00	Negativo	
M1E028D	Lupuna	AL000046	09-ago-12	D0	34.13				Negativo	
M1E028D	Lupuna	AL007539	05-jun-13	R1	31.76	27.00	147	1.00	Negativo	
M1E028D	Lupuna	AL010443	05-sep-13	R2	31.39	24.07	31	1.00	Negativo	
M1E036G	Lupuna	AL005118	14-mar-13	D0					Positivo	264
M1E036G	Lupuna	AL007330	03-jun-13	R1	27.55			1.00	Positivo	360
M1E037C	Lupuna	AL005121	14-mar-13	D0					Negativo	
M1E037C	Lupuna	AL007778	10-jun-13	R1	37.54				Negativo	
M1E046D	Lupuna	AL005199	18-mar-13	D0					Positivo	666
M1E046D	Lupuna	AL008128	17-jun-13	R1	23.42			1.00	Positivo	5154
M1E046D	Lupuna	AL010585	09-sep-13	R2					Positivo	1926
M1E050B	Lupuna	AL004868	09-mar-13	D0	35.32				Positivo	60
M1E050B	Lupuna	AL007792	10-jun-13	R1	30.96			1.00	Positivo	12
M1E052G	Lupuna	AL005285	21-mar-13	D0					Positivo	1698
M1E052G	Lupuna	AL015943	10-mar-14	R1	36.57				Negativo	
M1E053F	Lupuna	AL007628	06-jun-13	D0	33.02	29.15	257		Positivo	600
M1E053F	Lupuna	AL010460	05-sep-13	R1	35.96				Positivo	84
M1E062C	Lupuna	AL002336	10-dic-12	D0					Negativo	
M1E062C	Lupuna	AL007641	06-jun-13	R1	31.35			1.00	Positivo	1986
M1E064C	Lupuna	AL004919	11-mar-13	D0					Positivo	6000
M1E064C	Lupuna	AL008220	20-jun-13	R1	24.38			1.00	Positivo	1998
M1E064E	Lupuna	AL007647	06-jun-13	D0	35.25				Positivo	936
M1E064E	Lupuna	AL015890	08-mar-14	R1	27.34			1.00	Positivo	780
M1E067B	Lupuna	AL008026	13-jun-13	D0	26.39			1.00	Positivo	1590
M1E067B	Lupuna	AL010470	05-sep-13	R1	35.95				Negativo	
M1E074B	Lupuna	AL007810	10-jun-13	D0	28.45			1.00	Positivo	1560
M1E074B	Lupuna	AL010477	05-sep-13	R1	38.90				Negativo	
M1E076D	Lupuna	AL010209	03-sep-13	D0	23.50	27.89	30802	1.00	Positivo	3450
M1E076D	Lupuna	AL013681	27-dic-13	R1	25.17	26.42	4799	1.00	Positivo	5034
M1E078E	Lupuna	AL007584	05-jun-13	D0	24.55	29.42	41867	1.00	Positivo	3240
M1E078E	Lupuna	AL013718	02-ene-14	R1	23.15	25.58	9409	1.00	Positivo	6060

Cod. Ind. = Código de individuo

Cod. Muestra = Código de muestra

D0 = primer episodios; R1 = primera recurrencia; R2 = segunda recurrencia ; R3 = tercera recurrencia; R4 = cuarta recurrencia

Parasitemia GG = parasitemia por gota gruesa

ANEXO 10: BASE DE DATOS EPIDEMIOLOGICOS LUPUNA – 1

Cod. Ind.	Comunidad	Cod. muestra	Episodio	Edad	Género	Tratamiento	Medicamento	Fiebre	Escalofrios	Dolor de cabeza	Tiempo Comunidad	Malaria Viv en su vida	Malaria Viv ultimo año	Viaje ultimo mes +10Km
M1C001D	Lupuna	AL010106	D0	17	F	1	C + P	2	1	1	17 años	2 veces	2 veces	0
M1C001D	Lupuna	AL016291	R1	17	F	1	C + P	2	2	2	17 años	2 veces	2 veces	0
M1C001I	Lupuna	AL007500	D0	2	M	2		2	2	2	2 años	0	0	0
M1C001I	Lupuna	AL015555	R1	2	M	1	C + P	1	2	1	2 años	0	0	0
M1C003D	Lupuna	AL005382	D0	20	M	1	C + P	1	1	1	20 años	0	0	0
M1C003D	Lupuna	AL013639	R1	20	M	2		2	2	2	20 años	0	0	0
M1C008C	Lupuna	AL007337	D0	17	F	1	C + P	1	2	1	3 meses	1 vez	1 vez	0
M1C008C	Lupuna	AL013365	R1	17	F	1	C + P	2	2	2	3 meses	1 vez	1 vez	0
M1C009A	Lupuna	AL005084	D0	29	M	2		2	2	2	29 años	2 veces	0	0
M1C009A	Lupuna	AL015689	R1	29	M	2		2	2	2	29 años	2 veces	0	0
M1C015A	Lupuna	AL013368	D0	28	M	2		2	2	2	28 años	4 veces	0	0
M1C015A	Lupuna	AL016250	R1	28	M	2		2	2	2	28 años	4 veces	0	0
M1C017B	Lupuna	AL005358	D0	46	F	1	C + P	1	1	1	46 años	4 veces	0	0
M1C017B	Lupuna	AL007832	R1	46	F	1	C + P	2	2	2	46 años	4 veces	0	0
M1C024B	Lupuna	AL005374	D0	28	F	1	C + P	2	2	1	28 años	1 vez	0	0
M1C024B	Lupuna	AL010654	R1	28	F	2		2	2	2	28 años	1 vez	0	0
M1C031G	Lupuna	AL005214	D0	20	F	2		2	2	1	8 años	2 veces	0	0
M1C031G	Lupuna	AL007910	R1	20	F	2		2	2	2	8 años	2 veces	0	0
M1C037A	Lupuna	AL004610	D0	40	M	2		2	2	2	40 años	1 vez	0	0
M1C037A	Lupuna	AL005301	R1	40	M	2		2	2	1	40 años	1 vez	0	0
M1C063C	Lupuna	AL000330	D0	17	M	1	C + P	1	1	1	17 años	2 veces	0	0
M1C063C	Lupuna	AL005294	R1	17	M	1	C + P	1	1	1	17 años	2 veces	0	0
M1C063D	Lupuna	AL005241	D0	9	F	1	C + P	1	1	1	9 años	2 veces	0	0
M1C063D	Lupuna	AL007478	R1	9	F	1	C + P	1	2	2	9 años	2 veces	0	0
M1C063D	Lupuna	AL010982	R2	9	F	1	C + P	1	1	2	9 años	2 veces	0	0
M1C069B	Lupuna	AL005321	D0	31	F	2		2	2	1	31 años	1 vez	1 vez	0
M1C069B	Lupuna	AL007849	R1	31	F	1	C + P	2	2	1	31 años	1 vez	1 vez	0
M1C069C	Lupuna	AL007915	D0	11	F	1	C + P	1	1	1	11 años	0	0	0
M1C069C	Lupuna	AL015615	R1	11	F	1	C + P	2	2	2	11 años	0	0	0
M1C073E	Lupuna	AL010184	D0	17	F	1	C + P	2	1	1	10 años	0	0	0
M1C073E	Lupuna	AL012945	R1	17	F	1	C + P	2	2	2	10 años	0	0	0
M1C073E	Lupuna	AL015712	R2	17	F	1	C + P	2	2	2	10 años	0	0	0
M1C084D	Lupuna	AL013386	D0	24	F	2		2	2	2	24 años	0	0	0
M1C084D	Lupuna	AL015620	R1	24	F	1	C + P	2	2	2	24 años	0	0	0
M1C088A	Lupuna	AL013387	D0	54	M	2		2	2	2	45 años	5 veces	0	0
M1C088A	Lupuna	AL016135	R1	54	M	2		2	2	1	45 años	5 veces	0	0
M1C107D	Lupuna	AL005193	D0	48	F	2		2	1	1	48 años	3 veces	0	0
M1C107D	Lupuna	AL010793	R1	48	F	2		2	2	1	48 años	3 veces	0	0
M1D001B	Lupuna	AL004995	D0	53	F	2		2	2	1	53 años	3 veces	0	0
M1D001B	Lupuna	AL007951	R1	53	F	2		2	2	1	53 años	3 veces	0	0
M1D002C	Lupuna	AL005349	D0	10	M	1	C + P	1	1	1	10 años	2 veces	0	0
M1D002C	Lupuna	AL016315	R1	10	M	1	C + P	1	1	1	10 años	2 veces	0	0
M1D003A	Lupuna	AL010702	D0	23	M	2		2	2	2	23 años	77	77	0
M1D003A	Lupuna	AL013540	R1	23	M	2		2	2	2	23 años	77	77	0
M1D008B	Lupuna	AL005386	D0	24	F	1	C + P	1	1	1	5 años	1 vez	0	0
M1D008B	Lupuna	AL010987	R1	24	F	1	C + P	2	2	1	5 años	1 vez	0	0
M1D008B	Lupuna	AL015885	R2	24	F	1	C + P	2	2	2	5 años	1 vez	0	0
M1D010E	Lupuna	AL005068	D0	11	M	1	C + P	2	2	2	11 años	5 veces	0	0
M1D010E	Lupuna	AL010938	R1	11	M	2		2	2	2	11 años	5 veces	0	0

M = Masculino ; F = Femenino

1 = Sí ; 2 = No

77 = no aplica

C + P = Cloroquina + Primaquina

ANEXO 11: BASE DE DATOS EPIDEMIOLOGICOS LUPUNA – 2

Cod. Ind.	Comunidad	Cod. muestra	Episodio	Edad	Género	Tratamiento	Medicamento	Fiebre	Escalofrios	Dolor de cabeza	Tiempo Comunidad	Malaria Viv en su vida	Malaria Viv ultimo año	Viaje ultimo mes +10Km
M1D013A	Lupuna	AL004929	D0	38	M	2		2	2	2	3 años	3 veces	0	0
M1D013A	Lupuna	AL013513	R1	38	M	2		2	2	2	3 años	3 veces	0	0
M1D019A	Lupuna	AL001917	D0	54	M	2		2	2	2	59 años	4 veces	0	0
M1D019A	Lupuna	AL016005	R1	54	M	1	C + P	2	2	2	59 años	4 veces	0	0
M1D019C	Lupuna	AL007684	D0	20	M	1	C + P	2	2	2	20 años	5 veces	0	0
M1D019C	Lupuna	AL010203	R1	20	M	1	C + P	1	1	1	20 años	5 veces	0	0
M1D019D	Lupuna	AL005010	D0	17	M	1	C + P	1	1	1	17 años	3 veces	0	0
M1D019D	Lupuna	AL008109	R1	17	M	1	C + P	1	2	2	17 años	3 veces	0	0
M1D020C	Lupuna	AL010704	D0	13	F	1	C + P	1	1	1	13 años	4 veces	0	0
M1D020C	Lupuna	AL015951	R1	13	F	1	C + P	2	1	1	13 años	4 veces	0	0
M1D024A	Lupuna	AL007890	D0	36	M	2		2	2	2	36 años	10 veces	0	0
M1D024A	Lupuna	AL010501	R1	36	M	2		2	2	2	36 años	10 veces	0	0
M1D024B	Lupuna	AL007333	D0	42	F	2		1	1	2	3 años	11 veces	0	0
M1D024B	Lupuna	AL010619	R1	42	F	1	C + P	1	1	1	3 años	11 veces	0	0
M1D025I	Lupuna	AL005168	D0	7	F	1	C + P	1	1	1	7 años	0	0	0
M1D025I	Lupuna	AL007893	R1	7	F	1	C + P	2	2	2	7 años	0	0	0
M1D025I	Lupuna	AL013484	R2	7	F	1	C + P	2	2	2	7 años	0	0	0
M1D026C	Lupuna	AL002610	D0	12	F	1	C + P	2	2	1	12 años	1 vez	1 vez	0
M1D026C	Lupuna	AL007692	R1	12	F	1	C + P	2	2	1	12 años	1 vez	1 vez	0
M1D026F	Lupuna	AL008114	D0	31	M	1	C + P	2	2	2	31 años	10 veces	0	0
M1D026F	Lupuna	AL013341	R1	31	M	1	C + P	2	2	2	31 años	10 veces	0	0
M1D031A	Lupuna	AL002672	D0	33	M	2		2	2	2	33 años	6 veces	0	0
M1D031A	Lupuna	AL010845	R1	33	M	2		2	2	2	33 años	6 veces	0	0
M1D041F	Lupuna	AL002643	D0	5	M	2		1	1	1	5 años	0	0	0
M1D041F	Lupuna	AL008257	R1	5	M	1	C + P	2	2	2	5 años	0	0	0
M1D042A	Lupuna	AL004937	D0	42	M	2		2	2	2	8 años	2 veces	0	0
M1D042A	Lupuna	AL015434	R1	42	M	2		2	2	2	8 años	2 veces	0	0
M1D042D	Lupuna	AL005352	D0	14	M	1	C + P	2	2	2	8 años	3 veces	0	0
M1D042D	Lupuna	AL010965	R1	14	M	2		2	2	2	8 años	3 veces	0	0
M1D042D	Lupuna	AL015437	R2	14	M	1	C + P	2	2	2	8 años	3 veces	0	0
M1D044B	Lupuna	AL008119	D0	18	M	2		2	2	2	18 años	3 veces	0	0
M1D044B	Lupuna	AL016012	R1	18	M	2		1	1	1	18 años	3 veces	0	0
M1D050C	Lupuna	AL007975	D0	12	M	2		2	2	2	12 años	6 veces	0	0
M1D050C	Lupuna	AL015455	R1	12	M	2		2	2	2	12 años	6 veces	0	0
M1D051G	Lupuna	AL000624	D0	23	M	1	C + P	2	2	2	2 años	1 vez	0	0
M1D051G	Lupuna	AL015801	R1	23	M	1	C + P	2	2	2	2 años	1 vez	0	0
M1D052C	Lupuna	AL010948	D0	26	M	1	C + P	2	2	2	26 años	0	0	0
M1D052C	Lupuna	AL015963	R1	26	M	1	C + P	2	2	2	26 años	0	0	0
M1D052E	Lupuna	AL005208	D0	10	M	1	C + P	2	1	1	10 años	3 veces	0	0
M1D052E	Lupuna	AL010537	R1	10	M	2		2	2	2	10 años	3 veces	0	0
M1D052E	Lupuna	AL015802	R2	10	M	2		2	2	2	10 años	3 veces	0	0
M1D054C	Lupuna	AL007737	D0	12	M	1	C + P	1	2	2	12 años	2 veces	0	0
M1D054C	Lupuna	AL015804	R1	12	M	1	C + P	2	2	2	12 años	2 veces	0	0
M1D056E	Lupuna	AL007430	D0	8	F	1	C + P	1	1	1	8 años	0	0	0
M1D056E	Lupuna	AL015966	R1	8	F	2		2	2	2	8 años	0	0	0
M1E001C	Lupuna	AL002028	D0	19	M	1	C + P	2	2	2	8 años	1 vez	0	0
M1E001C	Lupuna	AL004651	R1	19	M	2		2	2	2	8 años	1 vez	0	0
M1E005D	Lupuna	AL000505	D0	11	F	1	C + P	2	2	2	11 años	1 vez	1 vez	0
M1E005D	Lupuna	AL001891	R1	11	F	2		2	2	2	11 años	1 vez	1 vez	0
M1E005D	Lupuna	AL004890	R2	11	F	2		2	2	1	11 años	1 vez	1 vez	0
M1E005D	Lupuna	AL010677	R3	11	F	2		2	2	2	11 años	1 vez	1 vez	0

M = Masculino ; F = Femenino
 1 = Sí ; 2 = No
 77 = no aplica
 C + P = Cloroquina + Primaquina

ANEXO 12: BASE DE DATOS EPIDEMIOLOGICOS LUPUNA -3

Cod. Ind.	Comunidad	Cod. muestra	Episodio	Edad	Género	Tratamiento	Medicamento	Fiebre	Escalofrios	Dolor de cabeza	Tiempo Comunidad	Malaria Viv en su vida	Malaria Viv ultimo año	Viaje ultimo mes +10Km
M1E013F	Lupuna	AL000017	D0	23	F	1	C + P	2	2	1	23 años	0	0	0
M1E013F	Lupuna	AL007523	R1	23	F	1	C + P	2	2	2	23 años	0	0	0
M1E018A	Lupuna	AL002044	D0	36	M	2		2	2	2	36 años	1 vez	0	0
M1E018A	Lupuna	AL008083	R1	36	M	2		2	2	2	36 años	1 vez	0	0
M1E020D	Lupuna	AL007872	D0	9	F	1	C + P	2	1	2	9 años	4 veces	1 vez	0
M1E020D	Lupuna	AL010966	R1	9	F	1	C + P	2	2	1	9 años	4 veces	1 vez	0
M1E024A	Lupuna	AL008124	D0	86	M	2		2	2	1	50 años	8 veces	0	0
M1E024A	Lupuna	AL010852	R1	86	M	2		2	2	2	50 años	8 veces	0	0
M1E024A	Lupuna	AL015650	R2	86	M	2		2	2	2	50 años	8 veces	0	0
M1E026A	Lupuna	AL007534	D0	30	M	1	C + P	2	2	1	30 años	2 veces	0	0
M1E026A	Lupuna	AL010564	R1	30	M	1	C + P	2	2	2	30 años	2 veces	0	0
M1E027A	Lupuna	AL002057	D0	68	M	2		2	2	2	44 años	4 veces	0	0
M1E027A	Lupuna	AL008247	R1	68	M	1	C + P	2	1	1	44 años	4 veces	0	0
M1E028C	Lupuna	AL010442	D0	34	M	2		2	2	1	12 años	2 veces	0	0
M1E028C	Lupuna	AL016146	R1	34	M	2		2	2	1	12 años	2 veces	0	0
M1E028D	Lupuna	AL000046	D0	31	F	2		2	2	2	32 años	2 veces	0	0
M1E028D	Lupuna	AL007539	R1	31	F	2		2	2	2	32 años	2 veces	0	0
M1E028D	Lupuna	AL010443	R2	31	F	2		2	2	1	32 años	2 veces	0	0
M1E036G	Lupuna	AL005118	D0	2	F	1	C + P	1	2	1	2 años	0	0	0
M1E036G	Lupuna	AL007330	R1	2	F	1	C + P	2	1	1	2 años	0	0	0
M1E037C	Lupuna	AL005121	D0	17	M	2		2	2	2	17 años	1 vez	0	0
M1E037C	Lupuna	AL007778	R1	17	M	2		2	2	2	17 años	1 vez	0	0
M1E046D	Lupuna	AL005199	D0	18	M	1	C + P	1	1	1	18 años	1 vez	1 vez	0
M1E046D	Lupuna	AL008128	R1	18	M	1	C + P	2	2	1	18 años	1 vez	1 vez	0
M1E046D	Lupuna	AL010585	R2	18	M	1	C + P	2	2	2	18 años	1 vez	1 vez	0
M1E050B	Lupuna	AL004868	D0	49	M	1	C + P	1	2	1	49 años	2 veces	0	0
M1E050B	Lupuna	AL007792	R1	49	M	1	C + P	2	2	2	49 años	2 veces	0	0
M1E052G	Lupuna	AL005285	D0	18	F	1	C + P	1	1	1	5 años	1 vez	0	0
M1E052G	Lupuna	AL015943	R1	18	F	2		2	2	2	5 años	1 vez	0	0
M1E053F	Lupuna	AL007628	D0	26	M	1	C + P	2	2	2	4 años	0	0	0
M1E053F	Lupuna	AL010460	R1	26	M	1	C + P	2	2	2	4 años	0	0	0
M1E062C	Lupuna	AL002336	D0	11	F	2		2	2	2	11 años	2 veces	0	0
M1E062C	Lupuna	AL007641	R1	11	F	1	C + P	2	2	2	11 años	2 veces	0	0
M1E064C	Lupuna	AL004919	D0	5	M	1	C + P	1	2	2	5 años	0	0	0
M1E064C	Lupuna	AL008220	R1	5	M	1	C + P	1	2	1	5 años	0	0	0
M1E064E	Lupuna	AL007647	D0	12	F	1	C + P	1	1	1	5 años	0	0	0
M1E064E	Lupuna	AL015890	R1	12	F	1	C + P	1	2	1	5 años	0	0	0
M1E067B	Lupuna	AL008026	D0	80	F	1	C + P	2	2	1	40 años	1 vez	0	0
M1E067B	Lupuna	AL010470	R1	80	F	2		2	2	2	40 años	1 vez	0	0
M1E074B	Lupuna	AL007810	D0	20	F	1	C + P	2	2	1	20 años	1 vez	1 vez	0
M1E074B	Lupuna	AL010477	R1	20	F	2		2	2	2	20 años	1 vez	1 vez	0
M1E076D	Lupuna	AL010209	D0	7	M	1	C + P	1	1	1	7 años	0	0	0
M1E076D	Lupuna	AL013681	R1	7	M	1	C + P	1	2	1	7 años	0	0	0
M1E078E	Lupuna	AL007584	D0	4	M	1	C + P	1	2	2	4 años	0	0	0
M1E078E	Lupuna	AL013718	R1	4	M	1	C + P	1	2	1	4 años	0	0	0

M = Masculino ; F = Femenino
 1 = Sí ; 2 = No
 77 = no aplica
 C + P = Cloroquina + Primaquina

**ANEXO 13: CORRELACIÓN CARGA PARASITARIA qPCR EN MUESTRAS DE SANGRE
EN PAPEL FILTRO VS SANGRE TOTAL**

	Carga qPCR	Carga qPCR
	Papel filtro	Sangre total
P1	67.3945892	56.0142022
P2	79.6789559	26.6213212
P3	72.530788	50.4785566
P4	52.2634973	36.8363337
P5	37.9840703	19.8871681
P6	64.4758601	32.9838792
P7	135.568501	134.526765
P8	145.392165	211.679537
P9	122.745109	88.8446391
P10	30.0675204	14.5830125
P11	17.7323045	9.33453523
P12	46.28148	21.7573305
P13	83.5946173	100.887446
P14	175.874408	94.2048481
P15	21.3731037	24.705573
P16	46.0313017	11.2502861
P17	275.051457	156.32504
P18	228.796489	224.452068
P19	237.185659	325.162631
P20	61.7735246	67.9046913
P21	45.0143159	41.0851196
P22	131.197162	138.711657
P23	8981.01965	6781.00549
P24	6908.39586	4104.10133
P25	2436.04778	1221.24856
P26	1489.44464	1300.4718
P27	1499.13478	648.95281
P28	16.0883045	26.2446148
P29	32.1551706	26.9300782
P30	95.1502808	60.3835984
P31	143.940693	58.894196
P32	911.322635	160.788657
P33	1033.48663	432.277532
P34	125.355578	1103.401
P35	81.8428132	18.2257567
P36	40.105157	4.42697853
P37	27.3709827	8.35156873
P38	17.1755893	14.0192614
P39	33.5033452	7.58982075
P40	171.965668	41.9587926
P41	65.7645865	59.0247061
P42	53.5669194	29.1239997

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0.97826237
Coefficiente de determinación R ²	0.95699727
R ² ajustado	0.9559222
Error típico	365.97851
Observaciones	42

ANEXO 14: RESUMEN DE LOS 17 MICROSATÉLITES UTILIZADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE MOI.

Grupo	MS	Motivo	Cromosoma	Primer forward	Primer reverse	T. bp	[]	T° a	Dilución ABI	Reportado
1	11.162	ATAC	Pv_Sal1_chr11	6FAM -TTTGTTAGGAGATCCGCTCG	TAAATGACACTTTGGCTTCC	167-215	0.5	60	0:10	Imwong et al 2007
	Ch2.121	TTA	Pv_Sal1_chr02	NED -CCTTGCTCTCCTGGCTCTTC	GTATGAGTGACCACCCTGGC	157-199	0.5	60	0:10	Laboratorio malaria UPCH
	14.297	AAG	Pv_Sal1_chr14	PET -TACACCCCTTAGGTCCTCGT	TGAAAAATGTTCCGCTACTT	191-215	0.5	55	0:10	Imwong et al 2007
2	Ch14.3021	TA	Pv_Sal1_chr14	6FAM -GCATTTGTTACATTGTTTTCTGT	GCAAGATGTGTCCTTTACA	203-259	1	55	0:120	Laboratorio malaria UPCH
	Ch14.2986	AT	Pv_Sal1_chr14	NED -TTCCTAAATAAAGCACCATG	ACCATTCTGTAAAATGTATGT	165-171	0.5	55	0:120	Laboratorio malaria UPCH
	Ch14.3010	AT	Pv_Sal1_chr14	PET -GATAAGATAAAACAACAAATGCG	AGGATGCTTCGGTTTGTCT	198-235	0.5	60	0:10	Laboratorio malaria UPCH
3	MS9	(GGA) ¹⁸	Pv_Sal1_chr08	6FAM -AGATGCCTACACGTTGACGA	CTGTCTTGAAGCTGCCCATGTGGTAAAT	148-181	0.5	55	0:120	Karunaweera et al 2006
	13.239	TTTA	Pv_sal1_chr13	NED -CAACAACAAAATGAATGACG	CCTACCTTTACGCGTTTTTA	182-194	0.5	58	0:120	Imwong et al 2007
	Ch14.2981	AT	Pv_Sal1_chr14	PET -CGATGAATCATTTTCGTCGCA	ACTCTTCTTTCAGCACTTTTGGCC	126-158	1	63	0:120	Laboratorio malaria UPCH
	MS6	(TCC) ² (TCT) ³ (CCT) ² (TCC) ² GCTTCT(TCC) ¹⁰	Pv_Sal1_chr11	VIC -GGTCTTCGGTGATCTCTGC	CTGTCTTGGAGGACATCAACGGGATT	209-245	1	55	0:15	Karunaweera et al 2006
4	Ch7.1360	AGT	Pv_Sal1_chr07	6FAM -GCAGCCAAAGGTGTAGT	GCAAAGGGTAGGGGAGA	105-305	0.5	55	0:120	Laboratorio malaria UPCH
	MS15	(TCT) ¹⁰	Pv_Sal1_chr05	NED -TGTTTGCAAAGGAATCCACA	CTGTCTTCGGCCAGATGAAAAGGATAA	217-295	1	55	0:10	Karunaweera et al 2006
	3.502	AACGGATG	Pv_sal1_chr3	PET -GTGACCAGATGGACCTAT	TCCTACTCAGGGGAACTACT	136-176	0.5	55	0:120	Imwong et al 2007
	MS20	(GAA) ¹ GAG(GAA) ¹ 3(CAA) ⁴ GAA(CAA) ⁵	Pv_Sal1_chr10	VIC -GCACAACAAATGCAAGATCC	CTGTCTTGTGGCAGTGGCTCATCTTCT	200-240	0.5	58	0:120	Karunaweera et al 2006
5	Ch2.122	ATA	Pv_Sal1_chr02	NED -AGCTGGATTGCCCTAACTGC	CGCATCATCGCATACGCTTG	188-209	0.5	60	0:120	Laboratorio malaria UPCH
	MS4	(AGT) ¹⁸	Pv_Sal1_chr06	PET -CGATTTACTGTTGACGCTGAA	CTGTCTTCAAAGGAACATGCTCGATGA	187-220	0.5	55	0:120	Karunaweera et al 2006
	Ch2.152	AAT	Pv_Sal1_chr02	VIC -GTCATTTTCTAGGCAAAGACAGC	TACGTTTCGCCATGTTCTCTG	104-211	1	63	0:120	Laboratorio malaria UPCH

**ANEXO 15: ANALISIS MULTIVARIADO FACTORES ASOCIADOS A LA PARASITEMIA DE INFECCIONES
RECURRENTES DE P. VIVAX EN MENORES DE 15 AÑOS.**

	Modelo ajustado						
	Efectos fijos				Efectos aleatorios		
	Coef.	exp.(Coef) IRR	IC 95%	p-valor	est.	s.e.	IC 95%
Constante	8.540	5115.931	(1994.684 - 13121.25)	<0.001	3.834	1.317	(1.955 - 7.519)
MOI	-2.168	0.114	(0.107 - 0.122)	<0.001			
Tiempo entre recurrencias (dias)	0.013	1.013	(1.012 - 1.013)	<0.001			
Fiebre	-2.424	0.089	(0.085 - 0.093)	<0.001			
Gota gruesa	3.322	27.713	(25.089 - 30.612)	<0.001			
Escalofríos	0.813	2.254	(2.089 - 2.432)	<0.001			
Dolor de cabeza	0.094	1.099	(1.039 - 1.162)	0.001			
Recurrencia							
R1	-3.753	0.023	(0.021 - 0.026)	<0.001			
R2	-1.861	0.156	(0.141 - 0.171)	<0.001			
R3	-8.680	0.000	(0.000 - 0.000)	<0.001			

Modelo de regresion lineal multinivel

p-value del Test de Wald

** p<0.05

ANEXO 16: LISTA Y CRONOGRAMA DE RECURRENCIAS DE LOS INDIVIDUOS DE CAHUIDE Y LUPUNA

Edad	Sexo	Codigo	2012				2013				2014		
			Ago	Set	Oct	Dic	Mar	Jun	Set	Dic	Ene	Mar	
30	F	CAH - M1A001A			DO ^P					R2 ^P	R3 ^P		R4 ^P
39	M	CAH - M1A005A		DO ^P						R1 ^P			
35	F	CAH - M1A005B									DO ^P		R1 ^P
14	M	CAH - M1A007C				DO ^P			R2 ^P				R3 ^P
25	M	CAH - M1A036D				DO ^P			R1 ^P				
47	M	CAH - M1A040A		DO ^P		R1 ^S							
33	F	CAH - M1A041B								DO ^P	R1 ^P		
12	M	CAH - M1A067D									DO ^P		R1 ^P
64	M	CAH - M1A078A								R1 ^P	R2 ^P		
43	F	CAH - M1A082B		DO ^P					R1 ^P				
67	M	CAH - M1A103A		DO ^P					R1 ^P				
8	M	CAH - M1A115D		DO ^S					R1 ^P				
29	M	CAH - M1A131A		DO ^P			R1 ^S				R2 ^P		
66	F	CAH - M1B009B				DO ^S			R1 ^P				
51	M	CAH - M1B011A			DO ^P	R1 ^P							
22	F	CAH - M1B012B				DO ^S				R2 ^P			
32	M	CAH - M1B022A			DO ^P	R1 ^P							
49	F	CAH - M1B023B			DO ^P				R1 ^P				
35	F	CAH - M1B024B				DO ^S			R1 ^S				
49	M	CAH - M1B027A		DO ^S					R1 ^S				
44	F	CAH - M1B031E		DO ^P					R1 ^P				
24	M	CAH - M1B033D			DO ^P				R2 ^S				
48	M	CAH - M1B036A			DO ^S	R1 ^P							
53	M	CAH - M1B043A		DO ^P							R1 ^S		
15	F	CAH - M1B043D		DO ^P		R1 ^P							
10	F	CAH - M1F031D								DO ^P	R1 ^P		R2 ^S
17	F	LUP - M1C001D								DO ^P			R1 ^P
20	M	LUP - M1C003D					DO ^P				R1 ^S		
17	F	LUP - M1C008C						DO ^P			R1 ^P		
17	M	LUP - M1C063C	DO ^P				R1 ^P						
9	F	LUP - M1C063D						R1 ^P	R2 ^P				
11	F	LUP - M1C069C						DO ^P					R1 ^P
17	F	LUP - M1C073E							DO ^P	R1 ^P			R2 ^P
24	F	LUP - M1C084D								DO ^S			R1 ^P
10	M	LUP - M1D002C					DO ^P						R1 ^P
24	F	LUP - M1D008B					DO ^P						R2 ^P
20	M	LUP - M1D019C						DO ^P	R1 ^P				
13	F	LUP - M1D020C							DO ^P				R1 ^P
42	F	LUP - M1D024B						DO ^S	R1 ^P				
12	F	LUP - M1D026C				DO ^P		R1 ^P					
14	M	LUP - M1D042D					DO ^P			R1 ^S			R2 ^P
18	M	LUP - M1D044B						DO ^S					R1 ^S
23	M	LUP - M1D051G		DO ^P									R1 ^P
12	M	LUP - M1D054C						DO ^P					R1 ^P
23	F	LUP - M1E013F	DO ^P					R1 ^P					
86	M	LUP - M1E024A						DO ^S	R1 ^S				
30	M	LUP - M1E026A						DO ^P	R1 ^P				
31	F	LUP - M1E028D						R1 ^S	R2 ^S				
7	M	LUP - M1E076D							DO ^P	R1 ^P			
4	M	LUP - M1E078E						DO ^P				R1 ^P	

DO = Primer episodio; R1 = Primera recurrencia; R2 = segunda recurrencia; R3 = tercera recurrencia; R4 = cuarta recurrencia

^S = infección subpatente; ^P = infección patente

CAH = Cahuide; LUP = Lupuna

M = masculino; F = femenino

ANEXO 17: CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE COMITÉ DE ETICA



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Vicerrectorado de Investigación
Dirección Universitaria de Investigación
Ciencia y Tecnología - DUICT

CONSTANCIA R-60 -13-15

El Presidente del Comité Institucional de Ética (CIE) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia hace constar que el comité de ética aprobó la **RENOVACION** del proyecto de investigación señalado a continuación.

Título del proyecto : “Impacto de los portadores asintomáticos en la epidemiología y control de la malaria en la Amazonía Peruana”
Código de inscripción : 57395
Investigador(es) principal (es) : Alejandro Llanos Cuentas, Joseph M. Vinetz

Cualquier enmienda, desviaciones y/u otras eventualidades deberá ser reportada a este Comité de acuerdo a los plazos y normas establecidas. El investigador reportará cada **6 meses** el progreso del estudio y alcanzará un informe al término de éste.

La presente **RENOVACIÓN** tiene vigencia desde el **09 de julio del 2015** hasta el **08 de julio del 2016**.

Los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Lima, 16 de junio del 2015

Dra. Frine Samalvides Cuba
Presidenta (e)

Comité Institucional de Ética en Investigación

