



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

**ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD
GENÉTICA Y ESTRUCTURA
GENÉTICA POBLACIONAL DE
Plasmodium falciparum CON
DELECCIONES EN LOS GENES *PFHRP2*
Y *PFHRP3* EN TRES COMUNIDADES
DE LA AMAZONÍA PERUANA**

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

MARIELLA QUISPE CARBAJAL

LIMA- PERÚ
2017

ASESORES DE TESIS

PhD. Dionicia Gamboa Vilela

Mg. Oscar Nolasco Cárdenas

DEDICATORIA

A mi familia, por su comprensión y apoyo durante esta etapa. En especial, a mi abuela María por ser un gran ejemplo de superación y perseverancia constante.

A mi madre Gloria y a mi hermano Oscar por siempre estar a mi lado.

A Javier Navarro, por brindarme una visión sin fronteras de la ciencia.

A la próxima generación de mujeres científicas peruanas.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora Dionicia Gamboa, por abrirme las puertas al Laboratorio de Malaria y por brindarme su tiempo y dedicación exclusiva a lo largo de este trabajo de investigación. Además, por ser un buen modelo a seguir en el desarrollo profesional de mujeres científicas decididas a cambiar la sociedad peruana.

A mi co-asesor Oscar Nolasco, por su paciencia y constante apoyo en el desarrollo de este trabajo de investigación. Aprecio su gran capacidad de discusión y pensamiento crítico como investigador.

A los miembros del jurado por las sugerencias constructivas.

A mis compañeros del “Core-C” del Laboratorio de Malaria quienes me ofrecieron su amistad y una sonrisa en todo momento.

A la Fundación Cristina e Ismael Cobián por financiar mis estudios de Maestría.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

Este trabajo de investigación fue financiado por Fogarty Training Grant (D43TW007120), el proyecto ICEMR-AMAZONIA (5U19AI089681, NIH-USA) en colaboración con el Instituto de Medicinal Tropical “Alexander von Humboldt” (IMTAvH) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH).

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo estimar la frecuencia de delección de los genes *pfhrp2*, *pfhrp3* y flanqueantes de *P. falciparum*, además de determinar la diversidad genética y estructura poblacional de los parásitos con delección en *pfhrp2/pfhrp3* empleando para el análisis genético los marcadores microsatélites. Este estudio descriptivo recolectó muestras de sangre en papel de pobladores de las comunidades de Cahuide, San José de Lupuna (setiembre 2012 a junio 2014); y de la comunidad de Santa Emilia (marzo a noviembre del 2013). Un total de 227 muestras positivas a *P. falciparum* fueron evaluadas para la amplificación por PCR convencional del exón-2 de *pfhrp2*, *pfhrp3* y genes flanqueantes. Además, se identificaron y estandarizaron protocolos de PCR para la amplificación de 20 marcadores microsatélites, que fueron evaluados en muestras de *P. falciparum*. Se encontró que el gen *pfhrp2* se encuentra delecionado con una frecuencia del 62%, el gen *pfhrp3* está delecionado en un 62.1%; además el 47% de parásitos presenta doble delección en *pfhrp2/pfhrp3*. Sobre los genes flanqueantes, existe delección preferencial de los genes PF3D7_08319000 (31.3%) y PF3D7_1372400 (22.9%). La genotipificación multilocus (MLG) con 5 marcadores microsatélites reveló una baja a moderada diversidad del parásito ($H = 0.32-0.41$) y un significativo linkage disequilibrium ($I_A^s = 0.158$, $p < 0.01$). La diferenciación genética poblacional fue moderada ($F_{st} = 0.50$, $p < 0.01$), con la presencia de dos grandes *clusters* poblacionales donde el *cluster* 1 está formado por el genotipo *Pfhrp2*- (39/48; Fisher= <0.001) y el *cluster* 2 por el genotipo *Pfhrp2*+ (52/64, Fisher= <0.001),

encontrándose una asociación significativa entre el genotipo *Pfhrp2* y la asignación hacia un *cluster* determinado.

Estos resultados indican que las deleciones en el gen *pfhrp2* y sus genes flanqueantes han incrementado y que existen deleciones en los genes flanqueantes a *pfhrp3* en los parásitos de la Amazonía Peruana. De manera similar, *P. falciparum* presenta una estructuración poblacional relacionada a la presencia del genotipo *pfhrp2*-.

PALABRAS CLAVES: *Plasmodium falciparum*, *pfhrp2*, deleción, microsatélites, PCR.

ABSTRACT

This research aimed to estimate the frequency of *pfhrp2*, *pfhrp3* and their flanking genes deletions in *P. falciparum* and to determine any association between the population structure with gene deletions by using microsatellite markers. A total of 1036 of dried spot samples were collected from September 2012 to June 2014 by monthly active case detection survey in the communities of Cahuide and San José de Lupuna; and from March to November 2013 from Santa Emilia, a remote community from the Peruvian Amazon. All samples were confirmed as positive by microscopy and/or qPCR and tested for *pfhrp2*, *pfhrp3* and their flanking genes amplifications by conventional PCR. In addition, we identified and standardized new PCR protocols for the amplification of 20 microsatellite markers. Our results showed a high *pfhrp2* and *pfhrp3* gene deletions frequency (62% and 62.3%); and that 47% of parasites lacked both *pfhrp2/pfhrp3* genes. Most importantly, flanking genes were also deleted, especially PF3D7_08319000 (31.3%) and PF3D7_1372400 (22.9%) putative genes. The multilocus genotyping (MLG) by using 5 microsatellite markers revealed important features of the parasite: a low to moderate genetic diversity ($H = 0.32 - 0.41$) and significant linkage disequilibrium ($I_A^s = 0.158$, $p < 0.01$). The population genetic differentiation was also moderate ($F_{st} = 0.50$, $p < 0.01$), with the discovery of two main clusters, as calculated in Structure v.2.3.2 where the most probable number of clusters was $K=2$. Thus, *P.falciparum* population sub-structure was formed by cluster 1, where most individuals were *Pfhrp2*- (39/48; Fisher= <0.001); by contrast, cluster 2 was formed by *Pfhrp2*+ (52/64, Fisher= <0.001), finding a statistically

significant association between *Pfhrp2* genotype and cluster assignment. Our findings reveal that *pfhrp2* and their flanking gene deletions have increased in the Peruvian Amazon. This is the first report that confirms deletions in *pfhrp3* flanking genes. Likewise, *P.falciparum* has a population structure related to the presence of *pfhrp2*-genotype.

KEY WORDS: *Plasmodium falciparum*, *pfhrp2*, deletion, microsatellites, PCR

GLOSARIO

Infección patente de malaria: infección de malaria detectada por microscopía.

Infección subpatente de malaria: infección de malaria detectada únicamente por diagnóstico molecular por PCR y no detectada por microscopía.

Marcador molecular: segmento de ADN ubicado en una posición exacta en un cromosoma, con o sin función biológica conocida, que presenta características específicas para el análisis genético.

Haploide: un solo juego de información genética

Locus: Posición particular única en el genoma

Alelo: una de las diferentes formas de un marcador molecular o un gen

Frecuencia alélica: proporción de los alelos de un cierto locus en la población total de estudio.

Haplotipo: combinación de alelos de diversos loci en un individuo.

Loci: posición particular de un gen o región de ADN en un cromosoma.

Infección monoclonal: una única clona del parásito en el hospedero.

Infección policlonal: presencia de dos o más clonas del parásito en el hospedero.

Desequilibrio de ligamiento: asociación no al azar.

Admixture: es el resultado del *inbreeding* entre dos o más poblaciones previamente aisladas.

LISTA DE ABREVIATURAS

ΔK : valor de delta K

ADN: ácido desoxiribonucleico

Cq: ciclo de cuantificación

Dd2: cepa Dd2 de *Plasmodium falciparum* recolectada de Indochina/Laos

dNTP: 2'-deoxinucleotidos 5'-trifosfato

F_{st} : coeficiente de diferenciación intrapoblacional

H: diversidad génica

HB3: cepa HB3 de *Plasmodium falciparum* recolectada de Honduras

H_e : heterocigocidad esperada

HRP2: proteína rica en histidina tipo-2

HRP3: proteína rica en histidina tipo-3

I^A_s : índice de asociación estandarizada

ITG: cepa ITG de *Plasmodium falciparum*

K: número de clusters o poblaciones desconocidas

LnPD: probabilidad de máxima verosimilitud

Mb: mega bases

MgCl₂: cloruro de magnesio

MLG: genotipificación multilocus

mM: milimolar

mol/ μ l: moléculas/ μ l.

nPCR: nested PCR

p/ μ l: parásitos por microlitro

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PDR: pruebas de diagnóstico rápido

PF3D7_0831700: gen putativo HSP-70

PF3D7_0831900: gen putativo PHIST-x

PF3D7_1372100: gen putativo PHIST-b

PF3D7_1372400: gen putativo acyl-CoA sintetasa

Pfhrp2: gen codificante de la proteína rica en histidina tipo-2

Pfhrp3: gen codificante de la proteína rica en histidina tipo-3

Q': número de copias del gen 18S rRNA

Q_{ind}: proporción de membresía de un individuo

STRs: repeticiones únicas en tándem

TBE: Tris Borato Acido EDTA

T_m: temperatura de melting

U: unidad

μ l: microlitros

ÍNDICE

| | | |
|-------------|--|----|
| I. | INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. | PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 4 |
| III. | MARCO TEORICO | 6 |
| 3.1 | Epidemiología de la malaria en Perú | 6 |
| 3.2 | Biología del parásito | 7 |
| 3.2.1 | Clasificación | 7 |
| 3.2.2 | Ciclo biológico | 8 |
| 3.2.3 | Genoma de <i>P. falciparum</i> | 9 |
| 3.3 | Diagnóstico de malaria | 10 |
| 3.3.1 | Microscopía | 10 |
| 3.3.2 | Pruebas de diagnóstico rápido | 11 |
| 3.4 | Deleción en los genes <i>pfhrp2</i> y <i>pfhrp3</i> de <i>P.falciparum</i> | 12 |
| 3.5 | Genética poblacional de <i>P.falciparum</i> | 15 |
| 3.5.1 | Diversidad genética | 15 |
| 3.5.2 | Estructura poblacional | 15 |
| 3.6 | Genotipificación multilocus | 17 |
| 3.6.1 | Marcadores microsatélites | 18 |
| IV. | JUSTIFICACIÓN | 20 |
| V. | HIPOTESIS Y OBJETIVOS | 21 |
| 5.1 | Hipótesis | 21 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 5.2 | Objetivo general | 21 |
| 5.3 | Objetivos específicos | 21 |
| VI. | METODOLOGIA | 22 |
| 6.1 | Diseño del estudio | 22 |
| 6.2 | Población, selección y tamaño muestral | 23 |
| | 6.2.1 Población | 25 |
| | 6.2.2 Tamaño de muestra | 26 |
| | 6.2.3 Criterios de inclusión y exclusión | 27 |
| 6.3 | Operacionalización de variables | 28 |
| | 6.3.1 Variables independientes | 28 |
| | 6.3.2 Variables dependientes | 28 |
| 6.4 | Materiales y métodos | 30 |
| | 6.4.1 Extracción de ADN genómico | 31 |
| | 6.4.2 Diagnóstico molecular (qPCR) | 31 |
| | 6.4.3 Re-amplificación de ADN genómico (WGA) | 33 |
| | 6.4.4 Amplificación por PCR de <i>pfhrp2</i> , <i>pfhrp3</i> y flanqueantes PF3D7_0831700, PF3D7_0831900, PF3D7_1372100 y PF3D7_1372400 | 33 |
| | 6.4.5 Genotipificación multilocus | 35 |
| | 6.4.5.1 Elección de marcadores microsatélites | 35 |
| | 6.4.5.2 Diseño de cebadores | 35 |
| | 6.4.5.3 Estandarización del PCR de microsatélites | 36 |
| | 6.4.5.4 Análisis de electroferogramas | 37 |

| | | |
|-------------|---|----|
| 6.5 | Consideraciones éticas | 38 |
| 6.6 | Plan de análisis | 39 |
| 6.6.1 | Determinación de la frecuencia de la delección de <i>pfhrp2</i> , <i>pfhrp3</i> y flaqueantes | 39 |
| 6.6.2 | Análisis de diversidad genética | 40 |
| 6.6.2.1 | Elaboración del archivo <i>input</i> | 40 |
| 6.6.2.2 | Cálculo de las frecuencias alélicas | 41 |
| 6.6.2.3 | Cálculo de la diversidad genética intrapoblacional | 41 |
| 6.6.2.4 | Cálculo de la diversidad genética interpoblacional | 42 |
| 6.6.2.5 | Desequilibrio de ligamiento global | 43 |
| 6.6.2.6 | Determinación de haplogrupos | 44 |
| 6.6.3 | Análisis de la estructura poblacional | 44 |
| 6.6.3.1 | Determinación del modelo de Inferencia Bayesiana | 45 |
| 6.6.3.2 | Determinación de <i>clusters</i> | 45 |
| 6.6.3.3 | Alineamiento de réplicas del coeficiente de membresía | 46 |
| 6.6.3.4 | Representación gráfica de la estructura poblacional | 46 |
| 6.7 | Análisis estadístico | 46 |
| VII. | RESULTADOS | 48 |
| 7.1 | Diagnóstico molecular de infecciones de malaria por <i>P. falciparum</i> | 48 |
| 7.2 | Cuantificación de niveles de parasitemia de <i>P. falciparum</i> | 49 |
| 7.3 | Frecuencia de la delección de <i>pfhrp2</i> , <i>pfhrp3</i> y genes flaqueantes | 50 |
| 7.4 | Genotipificación multilocus de las muestras de <i>P. falciparum</i> | 52 |
| 7.4.1 | Identificación y selección de marcadores microsatélites | 52 |

| | |
|---|-----------|
| 7.4.2 Estandarización de PCR de veinte marcadores microsatélites | 53 |
| 7.4.3 Amplificación de microsatélites en muestras de <i>P. falciparum</i> | 55 |
| 7.5 Análisis de diversidad genética de <i>P. falciparum</i> | 59 |
| 7.5.1 Frecuencias alélicas de cinco marcadores microsatélites | 60 |
| 7.6 Diversidad genética intrapoblacional de <i>P. falciparum</i> | 61 |
| 7.7 Diversidad genética interpoblacional de <i>P. falciparum</i> | 62 |
| 7.8 Desequilibrio de ligamiento global de <i>P. falciparum</i> | 63 |
| 7.9 Determinación de haplogrupos de <i>P. falciparum</i> | 65 |
| 7.10 Determinación de la estructura poblacional de <i>P. falciparum</i> | 67 |
| VIII. DISCUSIÓN | 71 |
| IX. CONCLUSIONES | 81 |
| X. LIMITACIONES DEL ESTUDIO | 82 |
| XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 83 |

LISTA DE TABLAS

Tabla 01. Diagnóstico molecular (qPCR) de malaria por comunidad de estudio

Tabla 02. Distribución del valor de Cq (carga parasitaria) en las infecciones de *P. falciparum*.

Tabla 03. Frecuencia de deleción en los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* de *P.falciparum* en 227 muestras

Tabla 04. Perfiles de deleción de *pfhrp2*, *pfhrp3* y genes flanqueantes de *P.falciparum* en 227 muestras

Tabla 05. Condiciones de PCR y variantes de PCR en la estandarización de microsatélites en la cepa de referencia ITG de *P. falciparum*

Tabla 06. Tamaño de alelos estimado por electroforesis capilar en la cepa de referencia ITG de *P. falciparum* analizado con el program Genemapper v.4.0

Tabla 07. Número de infecciones monoclonales y policlonales detectadas con marcadores microsatélites

Tabla 08. Características principales de cinco marcadores microsatélites en el estudio de diversidad genética y estructura poblacional en muestras de *P. falciparum*

Tabla 09. Distribución de las frecuencias alélicas de 5 marcadores microsatélites en la población total de *P.falciparum* de la Amazonía Peruana

Tabla 10. Heterocigosidad esperada (H_e) calculado en 112 muestras de *P. falciparum*

Tabla 11. Comparación de la diversidad genética interpoblacional (Estadístico F_{st}) en muestras de *P.falciparum* de tres comunidades de la Amazonía Peruana

Tabla 12. Análisis de desequilibrio de ligamiento para cada población de *P. falciparum* en la Amazonía Peruana

Tabla 13. Determinación de 8 haplotipos completos basado en cinco microsátélites en 52 muestras de *P. falciparum*

LISTA DE GRÁFICOS

Figura 01. Línea de tiempo de incidencia de malaria entre el periodo 2007 – 2015 en el departamento de Loreto, Perú

Figura 02. Ciclo biológico de *P. falciparum*

Figura 03. Mapa físico de la estructura del gen *pfhrp2* y sus genes flanqueantes de *P. falciparum*

Figura 04. Mapa físico de la estructura del gen *pfhpr3* y sus genes flanqueantes de *P. falciparum*

Figura 05. Flujograma de trabajo

Figura 06. Mapa de las comunidades de Cahuide, San José de Lupuna y Santa Emilia – Departamento de Loreto, Perú

Figura 07. Identificación del producto de amplificación de 20 marcadores microsatélites en la cepa de referencia ITG de *P. falciparum* en gel de agarosa

Figura 08. Eficiencia de amplificación de PCR de 20 marcadores microsatélites en 182 muestras reamplificadas de *P. falciparum*

Figura 09. Flujograma de muestras de *P. falciparum* analizadas en este estudio

Figura 10. Análisis del patrón de linkage disequilibrium pareado (LD pairwise) entre pares de loci de la población total de *P. falciparum* de la Amazonía Peruana

Figura 11. Determinación de 8 haplogrupos completos basado en cinco microsatélites en 54 muestras de *P. falciparum*

Figura 12. Determinación de la estructura poblacional putativa de *P. falciparum* en la Amazonía Peruana.

Figura 13. Representación gráfica de la probabilidad estimada para cada valor de K en la determinación de la estructura poblacional de *P. falciparum*.

Figura 14. Distribución de parásitos *Pfhrp2-* y *Pfh3rp2+* de *P. falciparum* en clusters poblacionales inferidos ($K=2$; ΔK : 156.81).

Figura 15. Distribución de parásitos *Pfhrp2-* y *Pfhrp2+* de *P. falciparum* en clusters poblacionales inferidos por comunidad de estudio ($K=2$; ΔK : 156.8).

ANEXOS

Anexo 01. Lista de muestras analizadas en la prevalencia de deleciones de *pfhrp2*, *pfhrp3* y genes flanqueantes de *P. falciparum*

Anexo 02. Lista de cebadores para diagnóstico molecular de malaria (qPCR-18S rRNA)

Anexo 03. Lista de las secuencias de cebadores y tamaños del producto esperado de la amplificación por PCR convencional de los genes *pfhrp2*, *pfhrp3* y flanqueantes de *P. falciparum*

Anexo 04. Representatividad de muestras analizadas y no analizadas de *P. falciparum* en el estudio

Anexo 05. Condiciones de master mix de PCR para la amplificación de los genes *pfhrp2*, *pfhrp3* y flanqueantes de *P. falciparum*

Anexo 06. Condiciones de ciclado de PCR convencional para la amplificación de los genes *pfhrp2*, *pfhrp3* y flanqueantes de *P. falciparum*

Anexo 07. Características del panel de 20 marcadores microsatélites de *P. falciparum*

Anexo 08. Condiciones de master mix de PCR convencional para la amplificación de marcadores de *P. falciparum*

Anexo 09. Condiciones de ciclado de PCR convencional para la amplificación de marcadores de *P. falciparum*

Anexo 10. Condiciones de master mix de nested PCR (nPCR) para la amplificación de marcadores de *P. falciparum*

Anexo 11. Condiciones de ciclado de nested PCR (nPCR) para la amplificación de marcadores de *P. falciparum*

Anexo 12. Condiciones de master mix de nested PCR (nPCR) modificado para la amplificación de marcadores de *P. falciparum*

Anexo 13. Condiciones de ciclado de nested PCR modificado para la amplificación de marcadores de *P. falciparum*

Anexo 14. Base de haplotipos basados en 5 marcadores microsatélites incluidas en el análisis de diversidad y estructura poblacional de *P. falciparum*

Anexo 15. Análisis de Inferencia Bayesiana en la determinación de la estructura poblacional putativa con cinco marcadores microsatélites de *P. falciparum*

Anexo 16. Determinación de haplogrupos en el genotipo *Pfhrp2* y *Pfhrp3* con cinco marcadores microsatélites de *P. falciparum*

I. INTRODUCCION

La malaria es una enfermedad tropical con una alta morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Se estima que 3, 2 mil millones de personas están en riesgo de ser infectados y desarrollar la enfermedad [1]. En el Perú, malaria es considerada una enfermedad reemergente, observándose un incremento en el número de casos en los últimos años. La forma más severa de la enfermedad se denomina “malaria cerebral” y es ocasionada por la especie *P. falciparum*. En la actualidad, el 16,9% de casos de *P. falciparum* se encuentra focalizados en el departamento de Loreto, en la Amazonía Peruana [2].

El diagnóstico de la enfermedad cumple un rol importante en la estrategia de control y tratamiento. La microscopía, como método *gold estándar*, es utilizada principalmente en centros de salud y postas médicas; sin embargo, requiere de personal altamente entrenado, es muy laboriosa y presenta una baja sensibilidad de detección en pacientes asintomáticos [3,4]. Por el contrario, el uso de pruebas de diagnóstico rápido (PDR) en zonas endémicas surgieron como alternativa por su bajo costo, fácil uso e implementación [5]. Gracias a su costo-efectividad, fueron incorporadas en cincuenta comunidades de la Amazonía Peruana [6,7].

Las pruebas de diagnóstico rápido, dirigidas a la identificación única de *P. falciparum*, detectan a la proteína rica en histidina tipo 2 (HRP2). Esta proteína es sintetizada en el ciclo asexual del parásito y su alta antigenicidad se debe al gran número de repeticiones en tándem de alanina e histidina [8,9]. Se ha reportado que

algunas PDR basadas en HRP2 generan reacciones cruzadas con la proteína homóloga, HRP3. Sin embargo, la principal causa de estos falsos negativos es la deleción conjunta de los genes *pfhrp2* y *pfhrp3*. Este evento crucial de parásitos con deleción en *pfhrp2* y *pfhrp3* fue descubierto en las cepas silvestres de la Amazonía Peruana [10].

Se estimó que la prevalencia de la deleción en el gen *pfhrp2* fue de 41 %; 70% para *pfhrp3*; y 21.6% de dobles negativos para *pfhrp2* y *pfhrp3* en muestras de pacientes recolectadas entre 2005-2010 en comunidades cercanas a Iquitos, Loreto [12]. Otro estudio retrospectivo concluyó que la frecuencia de deleción fue de 40.6% para *pfhrp2* en muestras recolectadas de comunidades de Caballococha, Padrecocha y Bellavista en Loreto. En consecuencia, este fenómeno de deleción tanto en *pfhrp2* y/o *pfhrp3* explicaría el alto número de falsos negativos y la variación en la sensibilidad de diversas pruebas rápidas en pacientes de la Amazonía Peruana [12]. A nivel mundial también se han reportado que los parásitos con deleción en *pfhrp2* y *pfhrp3* se encuentran distribuidos en Brasil, Mali, Senegal, e India [13-16]; y recientemente en Colombia donde la prevalencia de la deleción en *pfhrp2* se ha incrementado al 62% en muestras de pacientes infectados [17].

En general, la genética poblacional de *P. falciparum* ha sido poco explorada en la Amazonía Peruana, y se desconoce si los eventos de delección en genes *pfhrp2* y *pfhrp3* en los parásitos se deban al azar. El presente estudio determinó la frecuencia de las delecciones en *pfhrp2*, *pfhrp3* y sus respectivos genes flanqueantes; seguidamente la genotipificación multilocus (MLG), basada en la amplificación de marcadores microsatélites, permitió estudiar la diversidad genética y estructuración por *grupos* poblaciones de parásitos con delecciones de *P. falciparum* propias de la Amazonía Peruana.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La malaria es endémica en el Perú y actualmente se encuentra en estado de emergencia, donde el 16% de casos son originados por la especie de *P.falciparum*, causante de malaria severa [2]. En su mayoría, los pacientes infectados residen en las comunidades rurales y remotas de la Amazonía Peruana, zonas de alto riesgo de contraer la enfermedad. El diagnóstico de malaria se ve afectado negativamente por el alto número de falsos negativos de pruebas de diagnóstico rápido (*PDRs*) [9], subestimándose la incidencia de la enfermedad. El factor biológico más importante que explican la falla de las *PDRs* es la delección en los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* de *P. falciparum* [10] (antígenos blanco de estas pruebas), reportándose en las comunidades aledañas a la ciudad de Iquitos, Loreto.

En la actualidad, se desconoce la frecuencia de la ocurrencia de las delecciones de *pfhrp2* y *pfhrp3* y si estos ocurren al azar en las diversas poblaciones de *Plasmodium* en la Amazonía Peruana. A nivel global, se estima que los eventos de delección en *pfhrp2* y *pfhrp3* se han incrementado y presentan una frecuencia de hasta el 60% [17], particularmente en regiones de Sudamérica [18]. Sin embargo para el Perú, no existen estudios que hayan evaluado en detalle las diferentes combinaciones de delecciones entre *pfhrp2*, *pfhrp3* y sus genes flanqueantes en pacientes infectados por *P. falciparum* en zonas de baja transmisión como son las comunidades de Cahuide, San Jose de Lupuna y Santa Emilia. Determinar la frecuencia de las delecciones en *pfhrp2*,

pfhrp3 y sus genes flanqueantes permitiría una mayor información de la biología del parásito.

El presente estudio descriptivo planteó determinar las frecuencias de las deleciones de los genes *pfhrp2*, *pfhrp3* y sus genes flanqueantes en pacientes con infección por *P. falciparum*. Así mismo, para estudiar la genética de poblaciones en malaria se caracterizaron microsatélites (STRs) como marcadores moleculares a lo largo del genoma de *P. falciparum*[28]. En base a la genotipificación multilocus (MLG) con microsatélites, se logró estimar la diversidad y estructura poblacional en los parásitos con deleción en *pfhrp2* y *pfhrp3*. La mayor implicancia de este estudio es contribuir a un mejor entendimiento de las diversas poblaciones presentes de *P. falciparum* en base a los eventos de deleción en el contexto de la epidemiología local en estas localidades.

III. MARCO TEORICO

3.1 Epidemiología de malaria en el Perú

La malaria es una enfermedad tropical y es considerada una de las principales causas de mortalidad, con 214 millones de casos y 438 000 muertes en el mundo [1]. Durante la década de 1990, la incidencia de malaria incrementó drásticamente debido a cepas de *P. falciparum* resistentes a drogas en los departamentos de Piura y Tumbes [19]. Posteriormente, *P. falciparum* se reportó por primera vez en la región de Loreto, en la comunidad riverina de Padrecocha, ubicada a 15 km de la ciudad de Iquitos [20]. Las intensas inundaciones ocasionadas por fenómenos climatológicos como “El Niño” ocasionaron brotes epidemiológicos, reportándose un 95% de casos de casos por este patógeno [19, 20]. Posteriormente, intervenciones del fondo global a través del proyecto PAMAFRO (Proyecto de control de la Malaria en zonas de frontera: un enfoque comunitario) hicieron posible la disminución de casos de malaria, del 25% al 20% en el periodo 2005-2010 [21]. Sin embargo en los últimos años cinco años, la prevalencia de malaria ha incrementado considerablemente. En Loreto, el 99.6% de los casos son ocasionados por *P. falciparum*. A inicios del año 2012 se observa un incremento de 3,965 casos a 12,425 casos para el año 2015, lo cual confirma el resurgimiento de esta especie en la región Amazónica [2] (Figura 01).

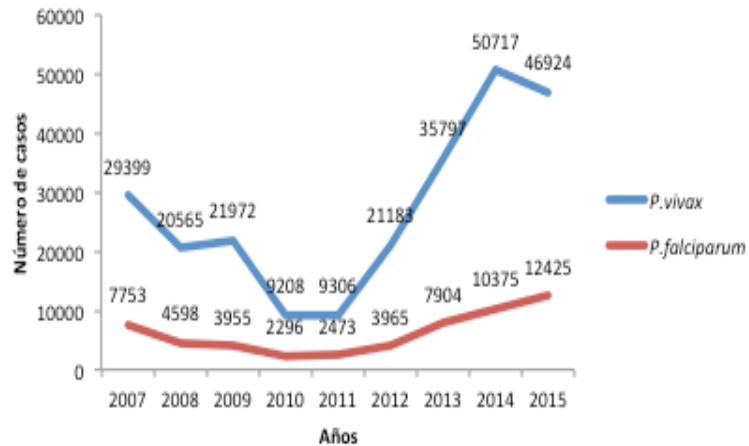


Figura 01. Línea de tiempo de incidencia de malaria entre el periodo 2007 – 2015 en el departamento de Loreto, Perú. [2]

3.2 Biología del parásito

P. falciparum es un patógeno eucariote con un ciclo biológico complejo. Gran parte de su vida transcurre en el mosquito hembra *Anopheles*, como organismo diploide. Por el contrario, en el humano se comporta como organismo haploide, generando diversas manifestaciones clínicas [4].

3.2.1 Clasificación

Malaria es una enfermedad infecciosa ocasionada por el protozoo unicelular del filo Apicomplexa, clase Aconoidasida, orden Haemosporoida y género *Plasmodium*. Este parásito presenta un complejo apical, de estructura tipo cono, el cual contiene la maquinaria necesaria para la invasión del hospedero. Existen más de 150 especies de *Plasmodium*, infectando a un amplio rango de hospederos definitivos como aves,

reptiles y mamíferos. De estos, solo cinco especies infectan al humano: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi* [22].

3.2.2 Ciclo biológico

En el ciclo biológico de *Plasmodium spp*, el humano es el huésped intermediario y el mosquito *Anopheles spp* es el huésped definitivo. La fase asexual está compuesta por dos estadios: exoeritrocítico y eritrocítico. Inicialmente, el humano es picado por un mosquito hembra del género *Anopheles*, el cual inocula esporozoítos [a] que migran al hígado por circulación sanguínea, donde forman esquizontes [b] mediante el ciclo exoeritrocítico. Una vez que los hepatocitos infectados se rompen, los merozoítos [c] son liberados e invaden a los glóbulos rojos, dando origen al ciclo eritrocitario [d] donde estos merozoítos maduran a trofozoítos [e], pasando por tres estadios: trofozoito joven, trofozoito adulto y finalmente esquizonte [f]. Posteriormente, un grupo de merozoítos dará lugar a formas sexuales del parásito, conocidos como gametocitos [g] masculinos (microgametocitos) y femeninos (macrogametocitos) durante 10-12 días. El mosquito vector se alimenta de sangre humana e ingiere dichos gametocitos, ocurriendo la fusión de gametos [h] que origina el cigoto [i], el cual se introduce en el epitelio intestinal del vector, dando lugar al ooquineto y al ooquiste [j] generando esporozoítos [k]. A continuación, los esporozoítos migran a las glándulas salivales, y el mosquito al picar a una nueva persona libera estos esporozoítos, inicia un nuevo ciclo de infección (**Figura 02**) [25].

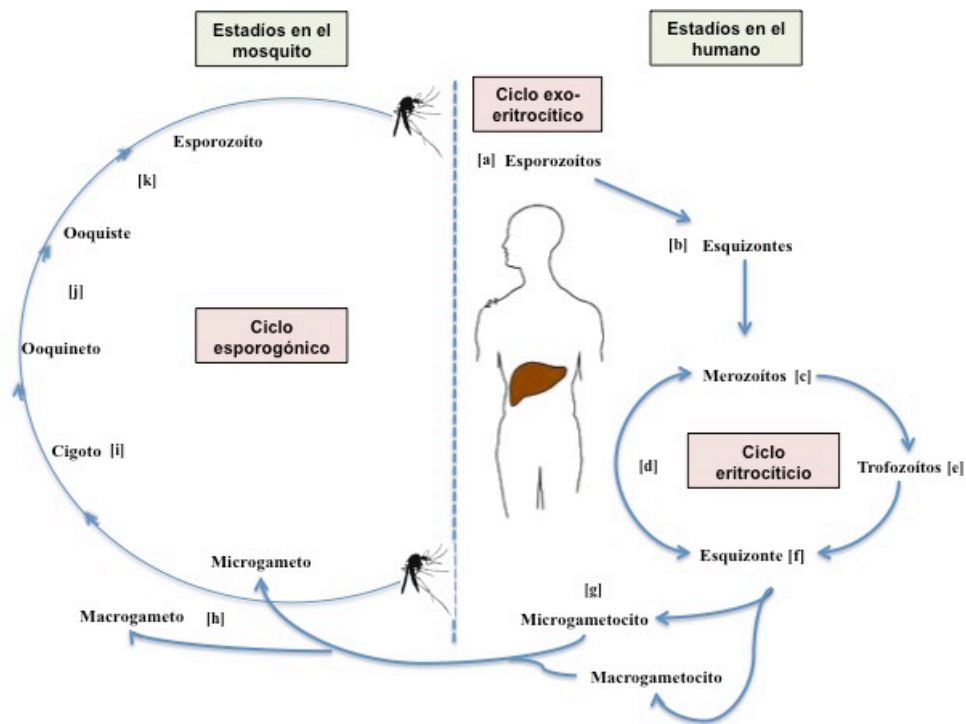


Figura 02. Ciclo biológico de *P. falciparum* [4].

3.2.3 Genoma de *P. falciparum*

El tamaño del genoma haploide de *P. falciparum* es de 24 Mb, consta de 14 cromosomas lineales, 6372 genes y 5524 proteínas codantes. La mitad de estos genes no presenta homología en otro organismo modelo [23]. El genoma completo de *P. falciparum* fue publicado en el año 2002, reportándose características importantes como su alto contenido de A+T hasta del 80.6%; y en intrones y regiones intergénicas esta distribución alcanza el 95%. Particularmente, presenta dos genomas circulares, uno mitocondrial de 6 kb y un apicoplasto de 35 kb. El genoma mitocondrial es uno de los más pequeños reportados y consta de tres genes: citocromo c oxidasa (Cox1),

citocromo c oxidasa (Cox2) y citocromo b (Cytb). Por el contrario, el genoma del apicoplasto codifica 30 proteínas involucradas en las vías metabólicas de ácidos grasos, isoprenos y síntesis del grupo heme [24].

3.3 Diagnóstico de malaria

Malaria se puede identificar mediante el diagnóstico directo e indirecto. En el diagnóstico directo, se busca la identificación morfológica de las diferentes especies de *Plasmodium*. Por el contrario, las técnicas basadas en la detección indirecta miden la presencia de proteínas antigénicas, anticuerpos o ADN. Algunos ejemplos de este tipo de diagnóstico se encuentran las pruebas de diagnóstico rápido (PDRs) y ensayos moleculares basados en la amplificación de ácidos nucleicos [25].

3.3.1 Microscopía

Es la prueba “*gold standard*” (prueba de oro), basado en la toma de muestra de sangre en lámina teñida con Giemsa para la identificación del parásito. Esta técnica tiene como principal ventaja el bajo costo y con una sensibilidad de desde 50 parásitos por microlitro de sangre, la cual es realizada por personal de laboratorio altamente calificado. Sin embargo, es laboriosa y requiere de constante entrenamiento que alcance niveles altos de exactitud [26].

3.3.2 Pruebas de diagnóstico rápido

El diagnóstico de malaria es crucial para el control y tratamiento de la enfermedad. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) existen dos métodos para el diagnóstico del parásito: la microscopia y las pruebas de diagnóstico rápido [26-27]. La microscopia, basada en la identificación morfológica del parásito, es el *gold estándar* en centros de salud. Este método puede detectar desde 50 parásitos por microlitro de sangre; sin embargo requiere de personal altamente entrenado, mayor tiempo de preparación e interpretación de láminas y en la mayoría de casos, bajas parasitemias y/o infecciones mixtas no son detectadas apropiadamente [28].

Una alternativa fue el desarrollo de pruebas de diagnóstico rápido (PDR) en zonas rurales y endémicas en la década de los noventa [32]. Las PDRs son tiras inmunocromatográficas fijadas con anticuerpos que detectan proteínas antigénicas de *Plasmodium* en muestras de sangre. Los blancos de estas pruebas son: la proteína rica en histidina tipo 2 (PfHRP2), lactato deshidrogenasa (LDH) y aldolasa [270].

Específicamente, la proteína rica en histidina tipo 2 (HRP2) es la más usada para el diagnóstico de *P. falciparum* debido a que es sintetizada por todos los estadios intraeritrocíticos del parásito, esta proteína de 30 kDa es soluble en agua, estable en calor y contiene 35% de histidina, 40% de alanina y 12% de aspartato en su secuencia. Su alta variabilidad antigénica es conferida a múltiples repeticiones de AHHAAD, AHH y AHHA A en tándem [31]. En el Perú, un estudio en cincuenta

comunidades periféricas de Iquitos, Loreto permitió determinar que la incorporación del uso de pruebas rápidas por promotores de salud resultó ser en una de las estrategias más efectivas en el diagnóstico. Entre las principales ventajas destacan su bajo costo y alta efectividad en comunidades de la Amazonía Peruana [6,7,32].

3.4 Deleción de los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* de *P. falciparum*

Debido al gran polimorfismo en la secuencia proteica de HRP2, estudios posteriores determinaron su relación con la sensibilidad de las PDRs. Un estudio analizó 75 aislados de *P.falciparum* proveniente de 19 países, concluyendo que verdaderamente existe una diferencia significativa entre las secuencias proteicas de estos aislados [8]. Las diversas combinaciones y número de repeticiones de aminoácidos de esta proteína afectan directamente el rendimiento de las PDRs, tal como se describió previamente [9]. Además, mucho de los anticuerpos que detectan a la proteína HRP2 reaccionan con su homólogo, la proteína rica en histidina tipo 3 (HRP3), por su alto grado de similitud en la secuencia de aminoácidos.

La proteína rica en histidina tipo 2 está codificada por el gen *pfhrp2*. El tamaño del gen *pfhrp2* (PlasmoDB ID: PF3D7_0831800) es de 1063 bp y se encuentra ubicado en el subtelómero del cromosoma 8. Está flanqueado 'upstream' por el gen PF3D7_0831700 y 'downstream' por el gen PF3D7_081900. El gen homólogo, *pfhrp3* (PlasmoDB ID: PF3D7_1372200) de 977 bp, está ubicado en el subtelómero

del cromosoma 13, flanqueado por el gen PF3D7_1372200 en posición ‘*upstream*’; y por el gen PF3D7_1372400 en posición ‘*downstream*’ [33] (Figura 3).

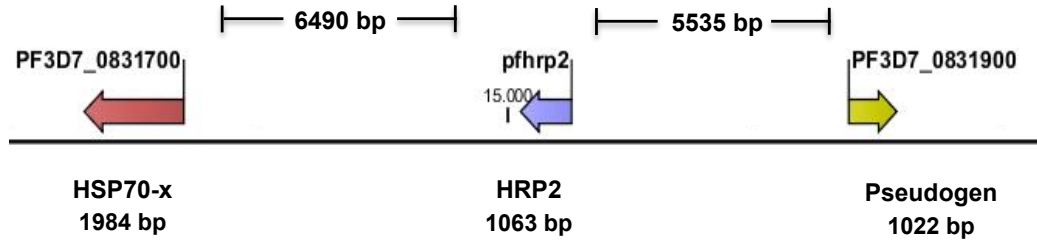


Figura 03. Mapa físico de la estructura del gen *pfhrp2* y sus genes flanqueantes de *P. falciparum*. El gen *pfhrp2* (Plasmo DB: PF3D7_0831800) se encuentra en la región subtelo mérica del cromosoma 8 de *Plasmodium falciparum*. El gen flanqueante mal7P1.228 (Plasmo DB: PF3D7_0831700) se encuentra a 6.49 kb ‘*downstream*’ y el gen mal7P1.230 (Plasmo DB: PF3D7_0831900) se encuentra 5.35 kb ‘*upstream*’. Fwd: primer forward, Rev: primer reverse, Amplicón: producto de PCR.

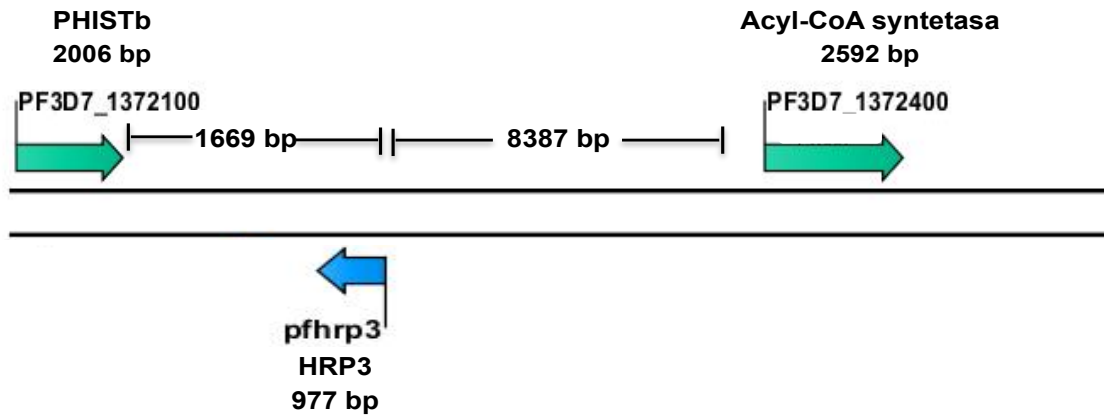


Figura 04. Mapa físico de la estructura del gen *pfhrp3* y sus genes flanqueantes de *P. falciparum*. El gen *pfhrp3* (Plasmo DB: PF3D7_1372200) se encuentra en el cromosoma 13 de *P. falciparum*. El gen flanqueante MAL13P1.475 (Plasmo DB: PF3D7_1372100) se encuentra a 1.684 kb ‘*downstream*’ y el gen MAL13P1.485 (Plasmo DB: PF3D7_1372400) se encuentra región 8.387 kb ‘*upstream*’. Fwd: primer forward, Rev: primer reverse, Amplicón: producto de PCR.

La evidencia más crucial que explica la baja sensibilidad de las PDRs fue el reciente descubrimiento de parásitos de *P. falciparum* con delección en los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* en la Amazonía Peruana [10, 33]. La delección de los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* fue descrita en muestras de pacientes infectados de las comunidades de Iquitos, Loreto. La prevalencia de la delección en *pfhrp2* y *pfhrp3* fue de 41% y 70%, respectivamente; mientras que el 21.6% de parásitos carecían de ambos genes [10]. Un estudio más actual demostró que la prevalencia de la delección en *pfhrp2* es del 20.7% en muestras recolectadas entre 1998 y 2001, con un incremento hasta el 40,6% entre 2003 y 2005 en muestras de *P.falciparum* recolectadas de las comunidades cercanas a Iquitos. El gen flanqueante a *pfhrp2*, P3D7_08311900 se encuentra delecionado en el 39.1% de las muestras recolectadas entre 1998 y 2001, con un notable incremento del 44.8% en muestras recolectadas entre 2003 y 2005. Contrariamente, el gen flanqueante P3D7_0831700 se encuentra delecionado en menor proporción, con 14.1% de muestras carentes para este gen [33]. Posteriormente, el análisis de ‘genome scanning’ en 14 aislados clínicos de *P.falciparum* de la Amazonía Peruana confirmó que existe una delección de 20 a 25 kb, la cual incluye a los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* ubicados en el cromosoma 8 y cromosoma 13, respectivamente [34]. En adelante, varios estudios reportan la presencia de parásitos con delección en estos genes en países como Brasil, Mali, Senegal, India y Honduras, Colombia y Guyana [13-18, 35]. En la actualidad, no se conoce con exactitud la dispersión geográfica de parásitos con delección de los genes *pfhrp2* o *pfhrp3* en los últimos años en la Amazonía Peruana.

3.5 Genética poblacional de *P. falciparum*

3.5.1 Diversidad genética

El estudio de la genética poblacional de *P. falciparum* es importante en el control epidemiológico de la enfermedad al utilizar marcadores moleculares [37]. El análisis de marcadores moleculares ha confirmado la existencia una baja diversidad genética de *P. falciparum*, la cual varía de acuerdo a su ubicación geográfica y estacionalidad [38-40]. Por ejemplo, en zonas de baja transmisión como Sudamérica y Sureste de Asia, existe desequilibrio de ligamiento significativo; baja diversidad genética y altos niveles de diferenciación geográfica entre poblaciones de parásitos [38]. En contraste, en zonas de alta transmisión como África, se observa recombinación genética al azar, alta diversidad genética y bajos niveles de diferenciación geográfica [39-41].

3.5.2 Estructura poblacional

La estructura poblacional de los patógenos es un parámetro fundamental para el entendimiento de la biología de estos organismos, con aplicaciones en epidemiología molecular, diseño de drogas y vacunas, y estrategias de control enfocada a las poblaciones del parásito [42]. La estructura putativa del parásito puede ser inferida por diversas metodologías como la Inferencia Bayesiana, implementada en programas bioinformáticos tales como Structure v.2.3.4 [43] que es utilizado en epidemiología molecular de malaria [44-46]. Esta herramienta utiliza data genotípica (a partir de marcadores RFLP, AFLP, SNPs o microsatélites) para inferir la presencia de diferentes poblaciones, asignar individuos a poblaciones, identificar migrantes y

de individuos de origen mixto, entre otros [43, 47]. STRUCTURE utiliza un método de agrupamiento sistemático Bayesiano el cual se basa en la estimación de cadenas de Monte Carlo y Markov (MCMC). El fundamento del cálculo de MCMC se basa en la asignación de individuos a un número predeterminado de grupos o clusters de manera aleatoria. Luego, las frecuencias alélicas variantes son estimadas en cada grupo y los individuos son nuevamente asignados de acuerdo a este nuevo cálculo de las frecuencias alélicas. Este proceso matemático es repetido miles de veces, y en términos generales compromete alrededor de 100,000 iteraciones, lo cual durante el proceso de burnin resulta en una convergencia progresiva hacia la estimación confiable y veraz de dichas frecuencias alélicas para cada población [47]. En primera estancia, STRUCTURE calcula la probabilidad posterior de la data en un rango de K clusters al estimar la probabilidad posterior de K, denominada X (denominada: $X|K$). Al especificar un rango de posibles valores de K para obtener los valores “X”, el valor de la probabilidad posterior se convierte cada vez mas pequeña en cada simulación. En cada simulación, el cálculo de la probabilidad posterior genera un coeficiente de membresía el cual es asignado para cada individuo en cada grupo [48].

Varios estudios en *P. falciparum* han determinado que existe una estructura poblacional, desde poblaciones panmíticas hasta poblaciones altamente clonales [49]. En Sudamérica, *P. falciparum* presenta una estructura poblacional de tipo clonal [56-57] debida a cuellos de botella ocasionados por las estrategias de control epidemiológico, ‘*inbreeding*’, baja transmisión y expansión del parásito [50]. En Perú, un único estudio ha reportado que el parásito mantiene una estructura

poblacional y una considerable diversidad genética utilizando doce marcadores microsatélites [51]. Actualmente, no existen estudios enfocados en la estructura poblacional de *P. falciparum* en la Amazonía, específicamente de las poblaciones de parásitos con delección en los genes *pfhrp2* y *pfhrp3*.

3.6 Genotipificación multilocus

La genotipificación multilocus (*MLG*) de parásitos es importante para la intervención y monitoreo de la enfermedad. La principal ventaja de la genotipificación de infecciones por malaria es poder identificar y discernir los haplotipos propios de un parásito, esenciales para la caracterización la diversidad y estructura genética en poblaciones naturales de *Plasmodium* [52]. Una de los métodos más informativos y ampliamente usados para determinar la composición genética en genética de poblaciones son los marcadores moleculares [53-54].

Antiguamente, muchas de las estrategias de genotipificación de *Plasmodium* consistían en el uso de RAPD (random amplified polymorphism DNA) [55,56], PCR-RFLP [57] , SSCP (single-stranded conformational polymorphism) [58], AFLP (amplified fragment length polymorphism) [59]; o mediante la amplificación de regiones polimórficas de las proteína de superficie de merozoito 1 (MSP1) y 2 (MSP2) [60] y GLURP (proteína rica en glutamato) [61]. Sin embargo, estas aproximaciones utilizan regiones altamente antigénicas que se encuentran bajo presión de selección, debido a la respuesta inmune del hospedero [62].

En la actualidad, la gran mayoría de estudios utiliza marcadores moleculares neutrales tales como microsatélites (STRs) y polimorfismos de nucleótido único (SNPs) los cuales proveen información valiosa de la diversidad genética del parásito y del espectro de la estructura poblacional para esta especie [38, 42]. En particular, algún cambio en la diversidad y/o estructura poblacional son detectados con este tipo de marcadores; y puedan dar indicios de cambios en el patrón de transmisión de la enfermedad, una variable importante en epidemiología molecular de malaria. [42]

3.6.1 Marcadores microsatélites

Los microsatélites, también conocidos como SSR (short sequence repeats) o STR (short tandem repeats) son repeticiones en tándem de 1-6 nucleótidos. Se encuentran altamente distribuidas en el genoma de eucariotes, en regiones no codantes y/o codantes. Son abundantes, codominantes, altamente polimórficos, neutrales y de herencia mendeliana. Además, presentan una alta tasa de mutación desde 10^{-6} hasta 10^{-2} eventos por locus por replicación. Esta última característica confiere el alto polimorfismo y se cree que es resultado del mecanismo evolutivo de “resbalamiento de la ADN polimerasa” durante el proceso de replicación [63, 64].

Existen microsatélites di-, tri-, tetra-, penta- y hasta hexanucleótidos. Los más comunes son las repeticiones dinucleótidas y son las más empleadas en investigación. Así mismo, se pueden clasificar en repetición simple o perfecta (una unidad de

repetición) y/o repetición imperfecta o compuesta (diferentes unidades de repetición) [64]. Entre las principales ventajas de los microsatélites, estos son capaces de detectar infecciones por múltiples clonas, distinguir entre recrudescencia y nuevas infecciones, comparar niveles de diversidad genética y el espectro de estructura poblacional en una determinada zona geográfica [67, 68]. En *P. falciparum* se han identificado más de 900 marcadores microsatélites cada 2-3 kb en regiones codantes y no codantes [54]. Estudios reportan un panel tradicional de 12 microsatélites neutrales el cual ha sido ampliamente utilizado en la diversidad genética a nivel local y global de regiones como África, Sureste de Asia y Sudamérica [38, 65, 66]. Estos marcadores se reportan en estudios más recientes de estructura poblacional en localidades de baja transmisión de malaria [51, 70]. En Amazonía Peruana, existen dos estudios basados en siete marcadores neutrales para la determinación de estructura poblacional, reportándose 5 linajes de *P. falciparum* denominados A, B, C, D y E [33, 50]. De la estructura poblacional de los parásitos con delección *pfhrp2/pfhrp3* no existen estudios en Perú, siendo un tema muy limitado.

IV. JUSTIFICACION

A pesar de las diversas medidas de control, malaria sigue siendo un problema de interés en salud pública en el Perú. La malaria por *P.falciparum* ha resurgido en la Amazonía Peruana, observándose un pico en el número de casos desde el año 2012 (3965 casos) y cuya tendencia es el incremento de la incidencia de la enfermedad, hasta el año 2015 (12 425 casos) [2]. En el Perú, se vienen desarrollando varias estrategias para la erradicación de malaria, que abarcan desde el mejoramiento de las herramientas de diagnóstico tales como las pruebas de diagnóstico rápido (*PDR*) hasta el estudio de la genética poblacional del parásito. Es importante recalcar que existen características biológicas únicas en *P. falciparum* que podrían influenciar en el uso de las pruebas de diagnóstico rápido como herramienta de control epidemiológico. En ese sentido, este estudio pretende estimar la frecuencia de los eventos de delección de los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* de *P. falciparum* en individuos de las comunidades de Cahuide, San José de Lupuna y Santa Emilia. Además, se logrará conocer la frecuencia de delección de los genes flanqueantes, los cuales han sido poco estudiados. Por otro lado, es importante tener un mejor entendimiento del parásito a nivel genético específicamente a nivel de diversidad genética y a nivel de estructura poblacional. De la información obtenida, se podrá establecer mejores medidas de seguimiento y control epidemiológico con respecto a las características particulares de *P. falciparum*, tales como el fallo en el uso de pruebas de diagnóstico rápido en la Amazonía Peruana.

V. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

5.1 HIPÓTESIS

Existen *clusters* diferenciados en los parásitos de *P. falciparum* que presentan deleciones en los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* provenientes de las comunidades de Cahuide, San José de Lupuna y Santa Emilia de la Amazonía Peruana.

5.2 OBJETIVO

GENERAL

Determinar los grupos poblacionales de los parásitos con deleción en los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* en individuos infectados con *P. falciparum* mediante Inferencia Bayesiana.

5.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar la frecuencia de deleción de los genes *pfhrp2*, *pfhrp3* y de sus genes flanqueantes en muestras de *P. falciparum*
- Estandarizar y evaluar la eficiencia de amplificación de nuevos marcadores microsatélites por PCR en muestras de *P. falciparum*.
- Genotipificar las muestras de *P. falciparum* por análisis multilocus utilizando marcadores microsatélites.
- Evaluar la diversidad genética en muestras de *P. falciparum*.

VI. METODOLOGIA

6.1 Diseño de estudio

Este estudio es de tipo descriptivo y retrospectivo desarrollado en las comunidades de Cahuide, San José de Lupuna y Santa Emilia. Para las comunidades de Cahuide y San José de Lupuna las muestras se colectaron durante el periodo de agosto 2012 a junio 2014 y para la comunidad de Santa Emilia, desde Marzo de 2013 a Noviembre de 2013. En un sistema de vigilancia activa se colectaron una muestra de sangre por punción digital mensualmente para realizar el diagnóstico por microscopia (gota gruesa y frotis) y sangre en papel filtro para el diagnóstico molecular (qPCR-18S rRNA). El diagnóstico molecular se realizó en el Laboratorio Satélite en Iquitos, Loreto con una confirmación en el Laboratorio de Malaria en Lima (Unidad de Epidemiología Molecular). La confirmación del diagnóstico molecular se realizó trimestralmente para Cahuide y Lupuna; y mensualmente para Santa Emilia durante el periodo de seguimiento. Solo las muestras positivas a *P. falciparum* fueron evaluadas para la amplificación de los genes *pfhrp2*, *pfhrp3* y flanqueantes. Posteriormente, estas muestras fueron reamplificadas para obtener mayor cantidad de ADN, y de esta manera realizar la genotipificación con veinte marcadores microsatélites. Con los datos haplotípicos obtenidos, se realizó el análisis de diversidad genética y estructura poblacional (**Figura 05**).

6.2 Población, selección y tamaño muestral

La población de estudio fueron habitantes de la Amazonía Peruana, incorporados en el sistema de vigilancia activa como parte del estudio cohorte “*Impacto de los portadores asintomáticos en la epidemiología y control de la malaria en la Amazonía Peruana*”, con código SIDISI: 57395 del Proyecto ICEMR-Amazonía. Los participantes de este estudio firmaron previamente un consentimiento informado según las Normas del Código de Ética y Bioseguridad. Todos los procedimientos fueron realizados siguiendo los lineamientos establecidos en la Declaración de Helsinki.

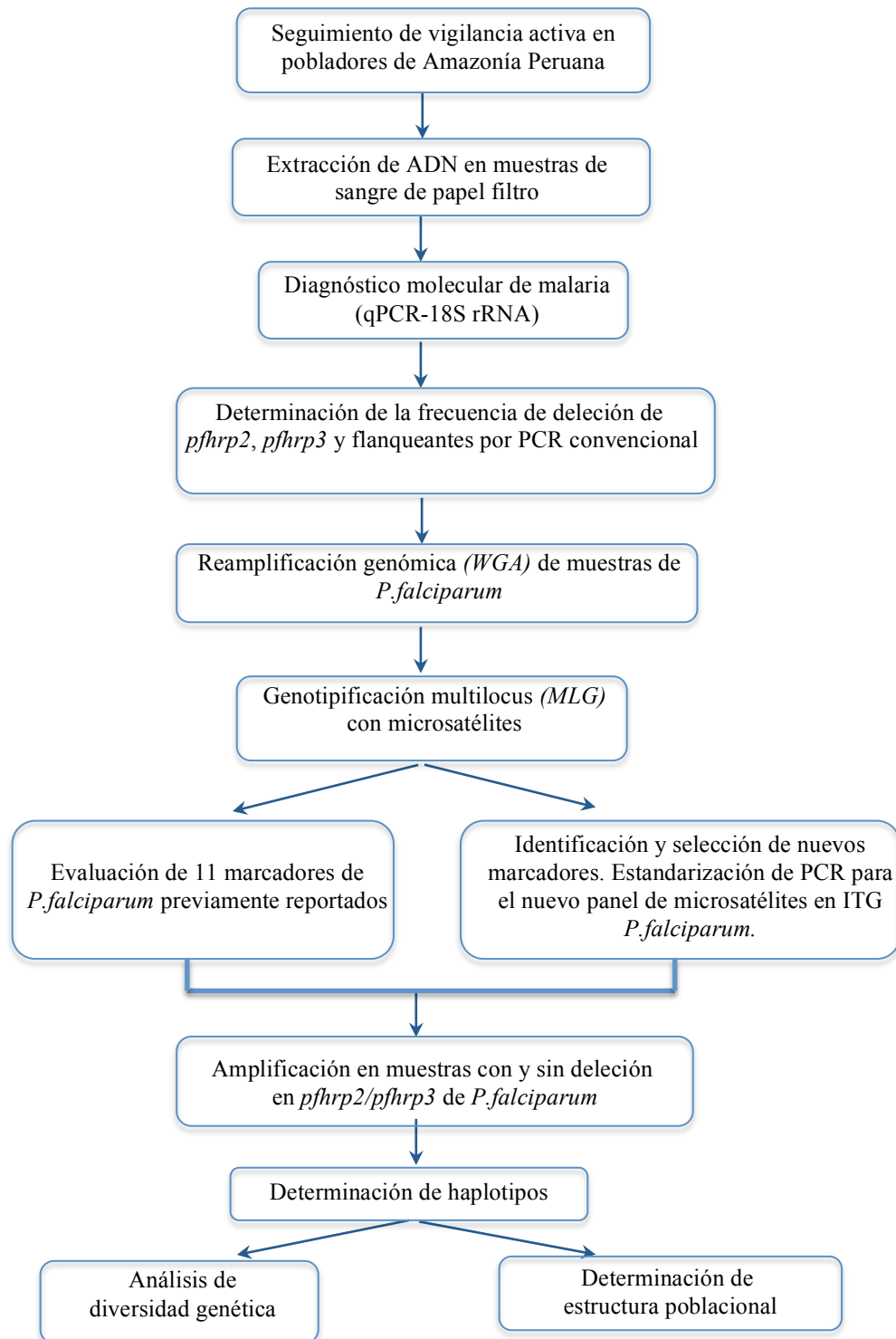


Figura 05. Flujograma de trabajo

6.2.1 Población

Tres comunidades rurales fueron parte de este estudio ubicadas en el Departamento de Loreto, Perú (**Figura 06**). La comunidad de San José de Lupuna (LUP) ($03^{\circ}44.591'S$, $73^{\circ}19.615'W$) es una comunidad rural y rivereña ubicada a 10 km de la ciudad de Iquitos, accesible a través del Río Nanay. Las principales actividades económicas de esta comunidad incluyen el cultivo de mandioca y la producción de carbón a partir de la quema de madera. La transmisión de malaria es estacional.

La comunidad de Cahuide ($04^{\circ}13.785'S/073^{\circ}276'W$), está localizada en el distrito de San Juan a 60 km de la ciudad de Iquitos, a lo largo de la carretera Iquitos-Nauta y a orillas del Río Itaya, afluente del río Amazonas. Esta comunidad peri-urbana es el centro de producción de palma. Presenta un patrón de transmisión heterogénea.

La comunidad de Santa Emilia ($4^{\circ} 11.754'S$, $74^{\circ}12.616'W$), ubicada a orillas del Río Tigre, se encuentra en una localización remota a 150 km de la ciudad de Iquitos y es únicamente accesible por bote. No cuenta con ningún centro o posta médica. Así mismo, no ha recibido intervención por parte del Ministerio de Salud. Aunque el patrón de transmisión de malaria es perenne, presenta ciertos picos en determinados meses del año.

Si bien la transmisión de malaria en el departamento de Loreto es estacional, existen picos en la temporada de lluvia de Enero a Junio [70]. *Anopheles darlingi* es el vector

antropofílico más importante de esta zona, distribuido principalmente en las comunidades alrededor de la ciudad de Iquitos. Los criaderos más comunes son arroyos, riachuelos y estanques de peces [71]. Recientemente, los distritos de Iquitos y San Juan han sido denominadas áreas de extremado y muy alto riesgo de malaria por *P. falciparum*, respectivamente [2].



Figura 06. Mapa de las comunidades de Cahuide (CAH), San José de Lupuna (LUP) y Santa Emilia (SEM) – Departamento de Loreto, Perú. Imagen tomada y modificada de Google Maps [73].

6.2.2 Tamaño de muestra

En este estudio, no se realizó un cálculo de tamaño muestral puesto que las muestras provienen del estudio cohorte previamente establecido del Proyecto ICEMR-

Amazonía. Se seleccionaron aquellas muestras de sangre en papel filtro de pacientes con diagnóstico positivo a *P. falciparum* determinado por qPCR. Las muestras recolectadas para las comunidades de Cahuide y San José de Lupuna corresponden a los meses de marzo, junio, setiembre y diciembre por cada año de recolección. Las muestras analizadas para la comunidad de Santa Emilia fueron captadas y analizadas en los meses de marzo, mayo, junio, julio, agosto, setiembre, octubre y noviembre del 2013.

6.2.3 Criterios de inclusión y exclusión

Los criterios de inclusión fueron:

- Individuos residentes de las comunidades de estudio que hayan firmado el consentimiento informado al inicio del estudio.
- Muestra positivas a *P. falciparum* determinados por qPCR cuantitativo, con un valor de Cq inferior a 33.5 (menor a 20 copias por reacción)
- Muestra de *P. falciparum* con suficiente cantidad de ADN (> mayor a 20 copias por reacción) para la amplificación de los seis genes y marcadores microsatélites.

Los criterios de exclusión fueron:

- Muestras negativas, no amplificadas y/o con infección mixta por *P. vivax*.
- Muestras de *P. falciparum* con un valor de Cq mayor a 33.5.
- Muestras de *P. falciparum* degradadas.

6.3 Operacionalización de variables

Unidad de análisis: Poblador de la Amazonía Peruana.

Unidad de muestreo: Poblador de la Amazonía Peruana que vive en la comunidad rural de San José de Lupuna, Cahuide y/o Santa Emilia que cumple con los criterios de inclusión.

6.3.1 Variables independientes

Comunidades rurales: Cahuide (CAH), San José de Lupuna (LUP) y Santa Emilia (SEM) de la Amazonia Peruana.

Tiempo: años de recolección de muestras 2012, 2013 y 2014.

6.3.2 Variables dependientes

Frecuencia de delección del gen: variable cuantitativa. Es el número de parásitos con delección en el gen *pfhrp2*, *pfhrp3* o flanqueante dividido entre el número total de parásitos de *P. falciparum* (qPCR-18S rRNA) multiplicado por 100%. Este parámetro fue calculado en cada comunidad de estudio.

Frecuencia alélica: es la proporción del alelo “X” en relación al total de alelos detectados en la población para un locus determinado. Varía entre 0 y 1.

Riqueza alélica: número promedio de alelos por locus independiente del tamaño de muestra. Representa el número total de alelos en la población.

Heterocigocidad esperada (H_e): es la diversidad genética intrapoblacional. Estima la probabilidad de que dos alelos escogidos al azar en una población sean diferentes. Varía entre 0 y 1, a mayor heterocigocidad el valor se acerca a 1.

F_{st} : es la diversidad genética interpoblacional. Es el grado de diferenciación genética entre pares de poblaciones. Varía entre 0 y 1. Poblaciones altamente diferenciadas presentan valores cercanos a 1; mientras que poblaciones semejantes tienen valores cercanos a 0.

Desequilibrio de ligamiento global: asociación no al azar entre los alelos de marcadores ligados. Indica si la población es de tipo clonal mediante el índice de asociación (I_A^S o ‘*Standardized index of association*’).

Cluster: es el número de poblaciones o subpoblaciones de *P. falciparum* determinado por los marcadores microsatélites más informativos para este estudio. Es una variable discreta, cuantitativa.

6.4 Materiales y métodos

6.4.1 Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico se realizó mediante el método de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (Sigma) [73]. Se cortó una región de 3x3 mm² de papel filtro con sangre infectada de paciente. Se agregó 250 µL de buffer TEN 2X (Tris-HCl 0.01M, EDTA 0.001M y NaCl 0.1M), 50 µL de SDS 10%, 20 µL de Proteínasa K (Qiagen) y 180 µL de H₂O PCR. Estas fueron agitadas con vortex e incubadas a 56°C con agitación constante por 1 hora. Posterior a la incubación, se agregaron 500 µL de solución de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). Después, se mezcló por inversión y se centrifugó a 13 000 x g por 5 minutos. La fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 ml, y se agregaron 500 µL de solución cloroformo/alcohol isoamílico, repitiéndose el paso anterior. Nuevamente, se retiró la fase acuosa a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 ml; y se agregó 0.2 volúmenes de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 1 volumen de etanol absoluto. Después de este proceso, las muestras fueron incubadas por un periodo de ~16 horas a -20°C. Al día siguiente, se centrifugó por 15 minutos a máxima velocidad. A continuación, se eliminó el sobrenadante por decantación y se dejó secar el pellet por 2 minutos en papel toalla. Se agregó 1 ml de etanol 70%, y nuevamente se centrifugó a máxima velocidad, eliminándose el sobrenadante. Para eliminar los restos de etanol, las muestras fueron

secadas a 65°C por 10 minutos. Finalmente, el ADN fue resuspendido en 50 µL de buffer TE (Tris 10mM, EDTA 1mM) y almacenadas a -20°C hasta su posterior uso.

6.4.2 Diagnóstico molecular (qPCR)

El diagnóstico molecular de la infección por malaria se realizó según lo previamente descrito [74]; mediante el uso de PCR en tiempo real (qPCR) con fluróforo SYBR Green. El blanco de amplificación fue el gen multicopia ribosomal 18S rRNA de *Plasmodium*. Se preparó una reacción de qPCR de 25 µl conteniendo 12.5 µl de PerfeCTa® SYBR® Green FastMix®, 6 µl de H₂O libre de nucleasas, 0.3 µM de primer forward PL1473F18 (5'-TAACGAACGAGATCTTAA- 3'), 0.3 µM de primer reverse PL1679R18 (5'-G TTCCTCTAAGAAGCTTT-3') y 5 µl de ADN extraído.

La amplificación de qPCR se realizó en un termociclador Real-Time PCR CFX Connect™ Bio-Rad con las siguientes condiciones de ciclado: denaturación inicial a 95°C/2min; 45 ciclos de denaturación 95°C/20 seg, hibridación 52°C/20 seg, extensión 68°C/30 seg; extensión final 68°C/3 min y denaturación 95°C/10 seg; curva de melting de 60°C hasta 90°C, con un incremento de 0.5°C por 5 seg. Las muestras positivas a *P. falciparum* presentaron una temperatura de melting de 72°C.

Para la determinación de carga parasitaria en cada muestra, se construyó una curva estándar de *P. falciparum* a partir de diluciones seriadas de ADN plasmídico

purificado que contenía una sola copia del gen ribosomal 18S rRNA de *P. falciparum* cepa ITG. Los puntos de la curva estándar incluyeron un rango de 2×10^6 copias/ μl hasta 2×10^0 copias/ μl por reacción de PCR, donde $c/\mu\text{l}$ expresa el número de copias del plásmidos por μl de reacción de qPCR. El número de copias del gen ribosomal 18S rRNA de *P. falciparum* en muestras de pacientes infectados fue determinado según la siguiente fórmula:

$$\text{Número de copias del gen 18S rRNA}/\mu\text{l} = \frac{Q' (\text{Número de copias del gen 18S rRNA})}{5 \times 5}$$

donde Q' fue estimado a partir de la ecuación de la recta de la curva estándar:

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

y donde Cq = ciclo de amplificación de la muestra problema; b = intercepto en el eje 'y'; a = tangente de la pendiente y 10 = factor de dilución de la curva estándar. Además, el término '5 x 5' representa el factor de normalización determinado por el volumen de muestra agregada en cada ensayo ($5 \mu\text{l}$) y el número de copias del gen 18S rRNA por genoma del parásito (5 copias).

Control positivo (Cepa ITG de *P. falciparum*), control negativo (ADN humano sin infección) y blanco (H_2O PCR) fueron incluidos en cada ensayo de qPCR.

6.4.3 Re-amplificación de genoma completo (*WGA*)

Para obtener una mayor cantidad de ADN genómico, las muestras de pacientes infectados con *P. falciparum* fueron reamplificadas mediante la metodología de amplificación de genoma completo (*WGA*, por sus siglas en inglés) [75]. Se utilizó el kit comercial Illustra GenomiPhi v.2, realizándose modificaciones en el protocolo. Se agregó 1 µl de ADN extraído y se mezcló con 9 µl de buffer de muestra. Luego, las muestras fueron denaturadas a 95°C por 3 minutos y enfriadas a 4°C en un termociclador Bio-Rad T100™ Thermal Cycler. A continuación, se preparó una solución de master mix que contiene 9 µl de buffer de reacción y 1 µl de enzima ADN Phi 29 polimerasa. Se agregó 10 µl de master mix a cada muestra, manteniendo la cadena en frío. Seguidamente, las muestras fueron incubadas a 30°C por 3 horas en un termociclador Bio-Rad T100™ Thermal Cycler. La enzima ADN Phi 29 polimerasa fue desactivada a 65°C por 10 minutos y enfriada a 4°C. Finalmente, las muestras reamplificadas fueron diluidas en 1/100 y seguidamente cuantificadas por el método de qPCR para estimar el número de copias genómicas.

6.4.4 Amplificación por PCR de los genes *pfhrp2*, *pfhrp3* y flanqueantes PF3D7_0831700, PF3D7_0831900, PF3D7_1372100 y PF3D7_1372400

Se realizó PCR convencional con primers específicos a la secuencia exónica 2 de los genes *pfhrp2*, *pfhrp3* y flanqueantes, tal como se describe previamente [10]. Para la amplificación de los genes *pfhrp2* y *pfhrp3*, se preparó una solución master mix de con las siguientes condiciones: 6 µl de H₂O libre de nucleasas, 1X Buffer PCR, 0.2

mM de dNTPs, 0.5 μ M de primer forward y 0.5 μ M primer reverse, 0.1 U de HotStart Taq ADN polimerasa (Invitrogen) y 5 μ l de ADN extraído, en un volumen final 25 μ l.

Para la amplificación de los genes flanqueantes PF3D7_0831700, PF3D7_1372100 y PF3D7_1372400 se preparó una solución master mix con las siguientes condiciones: 6 μ l de H₂O libre de nucleasas, 2.5 μ l Buffer 10X, 0.2 mM de dNTPs, 0.4 μ M de primer Fwd y 0.4 μ M primer Rev, 0.1 U de HotStart Taq DNA polimerasa (Invitrogen) y 5 μ l de ADN extraído, en un volumen final 25 μ l.

Para la amplificación del gen flanqueante PF3D7_0831900 se preparó una solución master mix con las siguientes condiciones: 6 μ l de H₂O libre de nucleasas, 1X Buffer PCR, 0.2 mM de dNTPs, 0.4 μ M de primer forwardy 0.4 μ M primer reverse, 0.1 U de HotStart Taq DNA polimerasa (Invitrogen) y 5 μ l de ADN extraído, en un volumen final 25 μ l.

El PCR convencional se realizó en un termociclador Bio-Rad T100TM Thermal Cycler. Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa 2% TBE 0.5X (Tris-borato 0.045 M y EDTA 0.001M) a 95 V por 50 minutos. La visualización de los productos teñidos con bromuro de etidio (0.5 μ g/mL) se realizó bajo un transluminador UV Bio-Rad y analizados con un fotodocumentador Gel DocTM XR+System Bio-Rad. El tamaño de los productos de PCR esperados fueron estimados con un marcador de ADN de 100 bp (Invitrogen).

Los controles de PCR incluyeron a la cepa ITG de *P. falciparum* como control positivo a los seis genes de interés; control negativo del gen *pfhrp2* (cepa Dd2) y control negativo del gen *pfhrp3* (cepa HB3) fueron utilizados en cada corrida de PCR. El límite de detección de PCR fue de 10 moléculas de ADN/ μ l de reacción.

6.4.5 Genotipificación multilocus

6.4.5.1 Elección de marcadores microsatélites

Se seleccionaron 11 microsatélites neutrales previamente reportados y descritos por Anderson *et al.*, 1999 [38]. Adicionalmente, se incluyeron nuevos microsatélites del mapa genético de *P. falciparum* [52] el cual se encuentra disponible online en la base de datos de NCBI. Ambos sets de marcadores microsatélites fueron estandarizados en la cepa ITG de *P. falciparum*; y luego amplificados en las muestras de pacientes con infección *P. falciparum* de las comunidades de estudio. Entre los criterios de selección del nuevo grupo de marcadores se consideró la longitud del motivo, el número de repeticiones y la localización genómica.

6.4.5.2 Diseño de cebadores

Para el nuevo panel de marcadores microsatélites de regiones no codantes a lo largo del genoma, se diseñaron cebadores específicos flanqueantes al motivo de repetición. Se utilizó el programa “Primer- BLAST” disponible en URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. Se consideraron los siguientes

parámetros: longitud de los cebadores entre 22-25 bp, %GC de 40 y T_m entre 45-55°C. Únicamente el cebador forward fue marcado con un fluoróforo comercial en el extremo 5': FAMTM, NEDTM, VICTM o PETTM.

6.4.5.3 Estandarización del PCR de microsatélites

La estandarización del PCR para la amplificación de los marcadores microsatélites se realizó con la cepa estándar ITG de *P. falciparum*. En el proceso de estandarización se evaluaron los siguientes parámetros: concentración de ADN de la cepa ITG, curva de temperatura de hibridación, curva de concentración de primers, curva de concentración de cloruro de magnesio y variante de PCR. Todos los PCR de microsatélites se estandarizaron en sistemas de PCR convencional simples.

Para establecer el límite de detección de los marcadores microsatélites, se realizó una curva estándar de *P. falciparum* cepa ITG a partir de diluciones seriadas de ADN plasmídico purificado, el cual contenía una única copia del gen 18S rARN. El número de copias de cada dilución fue ajustada en cada punto, teniendo como punto inicial 2.04×10^6 copias por reacción hasta 2.04 copias por reacción como punto final de la curva. Las amplificaciones de los 20 microsatélites en la cepa estándar ITG de *P. falciparum* fueron realizadas en un termociclador Bio-Rad T100TM Thermal Cycler. La confirmación de amplificación de productos de microsatélites fue analizada por electroforesis en gel de agarosa 2% TBE 0.5X (Tris-borato 0.045 M y EDTA 0.001M) a 95 V por 50 minutos. La visualización de los productos teñidos con

bromuro de etidio (0.5 µg/mL) fue realizada bajo un transluminador UV Bio-Rad. El tamaño de los productos fue comparado con un marcador de peso molecular de 50 bp (Amresco).

6.4.5.4 Análisis de electroferogramas

Paralelamente, la determinación del número y tamaño de los alelos de los productos de PCR convencional y PCR tipo nested fue estimada por electroforesis capilar. La lectura de los productos de amplificación de microsatélites incluyó la preparación de una solución mix que contiene 9.75 µl de Hi-Di™ Formamida (Applied Biosystems) y de 0.25 µl del marcador GeneScan™ 500 LIZ™ (rango entre 35 a 500 bp). Los marcadores microsatélites fueron evaluados en cinco grupos para ser leídos en el analizador genético ABI 3100 Avant (Applied Biosystems), el cual es capaz de analizar hasta cuatro fluoróforos por lectura. Antes de cada lectura, se realizaron ensayos pilotos ajustando la dilución del producto de microsatélite para los cinco diferentes grupos de marcadores. Para la electroforesis capilar, se cargó 1 µl de la dilución de cada grupo de microsatélites, los cuales fueron mezclados con 10 µl de solución mix. Seguidamente, la placa de muestras fue calentada a 95°C por 3 minutos, y enfriada a 4°C por 5 minutos en un termociclador Bio-Rad T100™ Thermal Cycler antes de ser analizada en el equipo ABI 3100 Avant (Applied Biosystems).

Finalizada la electroforesis capilar, el análisis de fragmentos consistió en la

estimación del tamaño del alelo (en pares de bases) para cada marcador microsatélite. El tamaño del microsatélite fue determinado con los programas GeneMapper v.4.0 (Applied Biosystems) y Peak Scanner Software v1.0 (Applied Biosystems). Los alelos para cada microsatélite en cada muestra de *P. falciparum* fueron analizados por inspección manual en cada electroferograma y normalizados con respecto al control positivo ITG de *P. falciparum*. Para cada muestra de *P. falciparum*, únicamente picos con mayores al 30% del pico dominante (valor alto de RFU o unidades de fluorescencia relativa) fueron considerados como un ‘alelo real’ [77]. Picos con valores de fluorescencia menores a 100 rfu fueron considerados como ruido o distorsión. La depuración de data cruda incluyó la identificación de picos ‘stutters’ (pico con altura de 1/3 menor al pico principal). Así mismo, la presencia de más de dos alelos para cada muestra fue interpretada como una co-infección de dos clonas distintas (infección policlonal). La presencia de alelos no amplificados fue reportada con un valor de ‘-9’.

6.5 Consideraciones éticas

Las muestras a utilizar provienen del estudio cohorte previo (“*Impacto de los portadores asintomáticos en la epidemiología y control de la malaria en la Amazonía Peruana*”, Código SIDISI: 57395), el cual cuenta con la aprobación del Comité de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Así mismo, los pacientes incluidos en el estudio cuentan con consentimiento informado por escrito según las Normas del Código de Ética y Bioseguridad. Todos los procedimientos

fueron realizados siguiendo los lineamientos establecidos en la Declaración de Helsinki.

6.6 Plan de análisis

6.6.1 Determinación de la frecuencia de deleción de los genes *pfhrp2*, *pfhrp3* y flanqueantes PF3D7_0831700, PF3D7_0831900, PF3D7_1372100 y PF3D7_1372400

La frecuencia de los genes *pfhrp2*, *pfhrp3* y flanqueantes PF3D7_0831700, PF3D7_0831900, PF3D7_1372100 y PF3D7_1372400 fue estimada para cada parásito de *P. falciparum* en cada una de las tres comunidades de estudio. La deleción del gen *pfhrp2*, *pfhrp3* o flanqueante se definió como la no amplificación del gen por PCR convencional, lo que indicaría la ausencia del gen. Por el contrario, la presencia del gen *pfhrp2*, *pfhrp3* o flanqueante fue definida como la presencia de un solo producto de amplificación (una única banda) determinado por PCR convencional, correspondiente a la secuencia exónica 2 del gen de interés. El cálculo de la frecuencia de deleción del gen *pfhrp2*, *pfhrp3* y genes flanqueantes en cada comunidad de estudio fue estimada según la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Número de infecciones con parásitos con deleción en el gen de interés}}{\text{Número total de infecciones con parásitos de } P. falciparum} \times 100\%$$

Las diferentes combinaciones de delección en los genes *pfhrp2*, *pfhrp3* y/o flanqueantes fueron estimadas a partir de los resultados de amplificación de PCR convencional. Se construyó una hoja de cálculo en Excel (Microsoft Corporation, USA) donde la presencia (resultado de PCR positivo) del gen fue representada con un valor de “1”; mientras que la ausencia del gen (resultado de PCR negativo) con el valor de “0”. En base a estos resultados, se utilizó el programa GenAIEx v.6.5 [78] con el objetivo de estimar la frecuencia de delección de los genes de interés y de los genes flanqueantes en el número total de muestras positivas a *P. falciparum*.

6.6.2 Análisis de diversidad genética de *P. falciparum*

6.6.2.1 Elaboración del archivo *input*

Se elaboró un archivo ‘*input*’ en una hoja de cálculo Excel (Microsoft Corporation, USA) el cual registró el código de muestra, fecha de recolección, comunidad de estudio, marcador microsatélite y el tamaño del alelo para cada marcador. De esta manera, se construyeron los diferentes haplotipos de 20 marcadores microsatélites en las muestras de *P. falciparum* para este estudio. Como primer filtro, se estimó el número de infecciones monoclonales y policlonales en base a 20 marcadores microsatélites en el total de muestras genotipificadas. Aquellas muestras con infección monoclonal fueron consideradas en este estudio, excluyéndose a las infecciones policlonales. Muestras con alelos no amplificados en los veinte marcadores microsatélites fueron asignados con un valor de ‘-9’. Marcadores con

'missing data' mayor al 50% fueron eliminadas del estudio, con la finalidad de quedarnos con los marcadores más representativos e informativos. Seguidamente, el archivo 'input' fue convertido a las diferentes extensiones de los software de genética de poblaciones con el programa GenAlEx v.6.5 [78].

6.6.2.2 Cálculo de las frecuencias alélicas

El número total de alelos por cada loci, la diversidad alélica (número de alelos por locus independientemente del tamaño de muestra) y el número de alelos detectados en una muestra fueron calculados para cada población con el programa FSTAT v.2.9.3 y GenAlEx v.6.5 [78, 79].

6.6.2.3 Cálculo de la diversidad genética intrapoblacional

La diversidad genética intrapoblacional o heterocigocidad esperada (H_e) (también denominada como diversidad génica (h)) es la probabilidad de que dos alelos escogidos al azar en una población sean diferentes [70]. Este parámetro está definido según la ecuación propuesta por Nei et al [80]:

$$H_e = \left[\frac{n}{(n-1)} \right] [1 - \sum p_i^2]$$

donde

p_i : frecuencia del alelo 'i' en la población.

n : número de alelos en un locus corregido por tamaño muestral

La heterocigosidad H_e tiene un rango entre 0 y 1, donde el valor de 1 representa una mayor variabilidad genética. Este parámetro fue calculado con el programa Genepop v.4.2 [81].

6.6.2.4 Diversidad genética interpoblacional

La diversidad genética interpoblacional también conocido como el índice de fijación subpoblacional, mide la correlación entre dos alelos escogidos al azar dentro de las subpoblaciones con relación a los alelos muestreados aleatoriamente del total de una población. Este parámetro mide la diferenciación genética entre las subpoblaciones [82]. Los valores de F_{st} se basan en las diferencias de frecuencias alélicas en cada población, variando de 0 (cuando no hay diferenciación entre las subpoblaciones) a 1.0 (diferencias completamente fijadas, es decir sin alelos compartidos). Este parámetro se define como:

$$F_{st} = (H_T - H_S) / H_T$$

donde H_S es la heterocigosidad esperada dentro de una población y H_T es la heterocigosidad esperada total. Así mismo, el F_{st} representa una medida del efecto Walhund, el cual es una deficiencia de heterocigotos debido a una subdivisión poblacional no detectada [86].

Los valores de F_{st} tienden a ser sesgados cuando existen muchos alelos por locus, por

lo tanto se recomienda corregirlo [84]. Esta corrección es expresada en función al F_{st} estandarizado = F_{st}/F_{st-max} . Además, F_{st-max} fue calculado mediante la recodificación de la data con el programa RecodeData v.0.1 [87] para así obtener la máxima divergencia entre poblaciones. Para determinar si el estadístico de F_{st} es significativamente diferente de cero, se aplicó un test de permutación de $n=10,000$. Este parámetro fue calculado con el programa Fstat v.2.9.3 [79].

6.6.2.5 Desequilibrio de ligamiento global

Para determinar el desequilibrio de ligamiento global presente en los parásitos locales de *P. falciparum*, se calculó el índice de asociación estandarizado (I_A^s). Este test compara la varianza (V_D) del número de alelos compartidos entre los haplotipos observados en la población (D), con respecto a la varianza esperada (V_E), asumiendo que existe una asociación de alelos al azar:

$$I_A^s = \frac{(VD / VE - 1)}{(r - 1)}$$

donde r = número de alelos analizados.

El I_A^s fue calculado con el programa LIAN v.3.5 [89], bajo la hipótesis nula de equilibrio de ligamiento ($I_A^s = 0$), es decir que existe segregación de los alelos al azar. Este parámetro fue calculado en dos niveles: haplotipos totales y haplotipos únicos.

6.6.2.6 Determinación de haplogrupos de *P. falciparum*

Para determinar el número y frecuencia de los haplogrupos de *P. falciparum*, se utilizó el programa HAPLOTYPE ANALYSIS v.1.05 [90]. Este programa estima los haplotipos para el set de marcadores completos por muestra, asignándole una nomenclatura de haplotipo.

6.6.3 Análisis de la estructura poblacional de *P. falciparum*

La estructura poblacional de los parásitos con delección en *pfhrp2* y *pfhrp3* de *P. falciparum* fue determinada mediante el análisis de Inferencia Bayesiana establecido en el programa STRUCTURE v.2.3.3 [91]. STRUCTURE asigna individuos, basado en las frecuencias alélicas de cada locus, a determinado número de *clusters* (representado como “*K*”) para un determinado set de marcadores microsatélites. En cada simulación, se utilizó un rango de “*K*” entre 1-10 (con 10 iteraciones en cada valor de *K*), un burn-in period de 50, 000 iteraciones y 150,000 repeticiones de Cadenas de Markov y Montecarlo (MCMC) como parámetros iniciales de corrida. Como análisis exploratorio, se realizó una simulación considerando a todos los individuos como una sola población de *P. falciparum*. Posteriormente, se analizaron las muestras para Cahuide, San José de Lupuna y Santa Emilia como poblaciones independientes. De esta forma, se compararon los valores de membresía (*Q*) del análisis de la población total versus los análisis independientes para cada comunidad.

6.6.3.1 Determinación del modelo de Inferencia Bayesiana

El análisis de la determinación de la estructura poblacional basado en Inferencia Bayesiana consideró un modelo *admixture*, empleado en el análisis de muestras total y en el análisis independiente por comunidad de estudio. Este modelo asume que los individuos presentan ancestría mixta, es decir el individuo i ha heredado de su ancestro parte de su genoma al *cluster* “ K ”. Este modelo asume que el origen de cada alelo es independiente, tal como se describe por Pritchard y Evanno [91-93].

6.6.3.2 Determinación de *clusters*

Para la estimación del valor de cluster “ K ” más probable, se calculó el valor de la probabilidad posterior (expresado como “*Estimated Ln Prob of Data*”), asumiendo el método de Evanno [93] con el programa STRUCTURE HARVESTER v0.6.8 [94]. Para la población total, primero se determinó una ventana de $K=1-10$. Seguidamente, se realizó una nueva corrida con los valores de delta K más altos del primer análisis, delimitando así la nueva ventana del valor de K . De la misma manera se aplicó este criterio para las corridas independientes por comunidad mencionadas anteriormente.

6.6.3.3 Alineamiento de réplicas del coeficiente de membresía

Para evaluar los ‘outputs’ de STRUCTURE, se utilizó el programa CLUMPP (CLUster Matching and Permutation Program) v.1.1.2 [95]. Este programa identifica

la variación existente entre réplicas de cada cluster para un rango de K clusters y es capaz de minimizar dicha variación al alinear los valores de membresía (Q) obtenidos de cada réplicas, generando una nueva matriz con los coeficientes individuales de membresía. El alineamiento o promedio de réplicas considera un algoritmo de búsqueda ‘*greedy*’ [95], el cual calcula todas las permutaciones posibles para cada corrida. En el análisis de la población total, se consideró un valor de membresía (Q) del individuo $> 90\%$ de pertenecer a un *cluster* específico. En las corridas independientes, la pertenencia hacia determinado *cluster* fue elegido de acuerdo al valor más alto de membresía (Q).

6.6.3.4 Representación gráfica de la estructura poblacional

Los valores de membresía alineados correspondientes a los *clusters* fueron graficados y visualizados con el programa DISTRUCT v.1.1 [96] en el total de muestras analizadas.

6.7 Análisis estadístico

En este estudio, en análisis estadístico y visualización de los datos fue realizado con el programa STATA (v.14, College Station, TX) [97].

1. Para la estimación de las frecuencias de delección de los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* y genes flanqueantes, se calculó el intervalo de confianza (CI) al 95% para evaluar la fuerza de asociación entre las variables.
2. Con el fin de evaluar si existe una diferencia estadística entre las proporciones de clusters diferenciados en los parásitos con delección y parásitos sin delección, se construyó una tabla 2 x 2 aplicándose la prueba de Chi-cuadrado y así brindar mayor robustez a la data.
3. El cálculo de los diferentes índices de diversidad genética fueron estimados significativamente estadísticos con un valor de $p < 0.05$.

VII. RESULTADOS

7.1 Diagnóstico molecular de infecciones de malaria por *P. falciparum*

El diagnóstico molecular basado en PCR en tiempo real con fluoróforo SYBR-Green permitió la identificación de especies de *Plasmodium* en muestras de pacientes. La presencia de un único pico de temperatura de melting (T_m) de 72°C indicó un resultado positivo para la especie de *P. falciparum*. Un total de 1036 muestras de papel filtro fueron recolectadas entre los años 2012 al 2014, de las cuales el 52.41 % (543/1036) fueron positivas a malaria por *P. falciparum* identificadas con PCR en tiempo real. El porcentaje mayor de infecciones de *P. falciparum* se encontró en la comunidad de Cahuide (21.13%), seguida de la comunidad de Santa Emilia (17.18%) y finalmente en San José de Lupuna (14%) (**Tabla 01**).

Tabla 01. Diagnóstico molecular (qPCR) de malaria por comunidad de estudio

| Comunidad de estudio | Cahuide | | San José de Lupuna | | Santa Emilia | | Total | |
|----------------------------|---------|-------|--------------------|------|--------------|-------|-------|-------|
| | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Total analizado PCR | 333 | | 375 | | 258 | | 1036 | |
| <i>P. falciparum</i> | 219 | 21.13 | 146 | 14 | 178 | 52.41 | 543 | 52.41 |
| <i>P. vivax</i> | 77 | 7.43 | 99 | 9.55 | 22 | 2.12 | 198 | 19.11 |
| Mixto | 35 | 3.37 | 31 | 2.99 | 34 | 3.28 | 100 | 9.65 |
| Negativo | 72 | 6.98 | 99 | 9.55 | 24 | 2.31 | 195 | 18.82 |

7.2 Cuantificación de niveles de parasitemia de *P.falciparum*

La curva estándar a partir del plásmido pGEM-T conteniendo el gen multicopia 18S rARN de *Plasmodium* permitió determinar la cantidad de copias de ADN por microlitro en muestras de pacientes infectados. Por conveniencia, se estableció un punto de corte de Cq (ciclo de amplificación) de 33.5 que corresponden a 20 copias del gen target. Así, las muestras de *P. falciparum* fueron agrupadas en dos categorías: Cq temprano y Cq intermedio. Muestras de Cq tardío o baja parasitemia fueron excluidas de este estudio (Cq >33.5). En base a esta selección, solo 227 muestras cumplieron con este criterio de inclusión. En líneas generales, se observa que el 75.25% de las muestras de este estudio corresponden a Cq intermedio; mientras que el 24.65% a Cq temprano. A nivel de comunidad, el 40.96% del total de muestras provienen de Santa Emilia; el 33.46% a Cahuide y el 25.48% a San José Lupuna (Tabla 02).

Tabla 02. Distribución del valor de Cq (carga parasitaria) en las infecciones de *P.falciparum*

| Comunidad de estudio | Cahuide | | San José de Lupuna | | Santa Emilia | | Total | |
|------------------------|---------|-------|--------------------|-------|--------------|-------|-------|-------|
| | n | % | n | % | N | % | n | % |
| Total analizado | 76 | 33.46 | 58 | 25.48 | 93 | 40.96 | 227 | |
| Cq temprano | 14 | 6.16 | 14 | 6.16 | 14 | 6.16 | 56 | 24.65 |
| Cq intermedio | 62 | 27.3 | 41 | 18 | 68 | 29.95 | 171 | 75.25 |

7.3 Frecuencia de la delección de *pfhrp2*, *pfhrp3* y genes flanqueantes

Se estimó la delección de *pfhrp2* y *pfhrp3* con la técnica de PCR convencional (blanco: secuencia exónica-2) en un total de 227 muestras. La frecuencia de la delección del gen *pfhrp2* fue altamente prevalente en el 62% (47/76, 95% IC [49.99-72.75], $p < 0.001$) de las muestras de la comunidad de Cahuide, seguida de 53.4% (31/58, 95% IC [39.87-66.65], $p < 0.001$) en San José de Lupuna y en un 47.3% (44/93, 95% IC [36.86-57.93], $p < 0.001$) en Santa Emilia (**Tabla 03**).

Tabla 03. Frecuencia de delección en los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* de *P.falciparum* en 227 muestras

| Comunidad de estudio | Cahuide | | San José de Lupuna | | Santa Emilia | | Total | |
|-------------------------------------|------------|---------------|--------------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|
| | n | IC 95% | n | IC 95% | n | IC 95% | n | IC 95% |
| Variable | 76 | | 58 | | 93 | | 227 | |
| Delección en <i>pfhrp2</i> | | | | | | | | |
| Si | 47 (62%) | [49.99-72.75] | 31 (53.4%) | [39.87-66.65] | 44 (47.3%) | [36.86-57.93] | 122 (53%) | [47-60] |
| No | 29 (38.2) | [33.34-60.12] | 27 (46.6%) | [27.24-50] | 49 (52.7%) | [42.06-63.13] | 105 (46.25%) | [39.6-52.97] |
| Delección en <i>pfhrp3</i> | | | | | | | | |
| Si | 34 (45%) | [33.31-56.85] | 36 (62.1%) | [48.37-74.48] | 40 (43%) | [32.78-53.94] | 110 (48%) | [41.79-55.16] |
| No | 42 (55.3%) | [43.41-66.68] | 22 (37.9%) | [25.51-51.62] | 53 (57%) | [46.30-67.21] | 117 (51.54%) | [44.83-58.2] |
| Delección en <i>pfhrp2/3</i> | | | | | | | | |
| Si | 29 (38%) | [27.24-50.02] | 27 (36%) | [33.33-60.12] | 28 (37%) | [21.02-40.04] | 84 (37%) | [30.77-43.64] |
| No | 47 (62%) | [49.97-72.75] | 31 (64%) | [39.87-66.65] | 65 (63%) | [59.50-78.74] | 143 (62.99%) | [56.63-69.2] |

Los parásitos de *P. falciparum* que provocaron la infección en las comunidades analizadas presentaron diversos patrones de delección en los genes *pfhrp2*, *pfhrp3* y flanqueantes. Se determinaron 8 diferentes perfiles para cada gen *pfhrp2* y *pfhrp3* analizado por PCR convencional (**Tabla 04**). El 31.3% (71/227) presentó delección en ambos genes *pfhrp2* y PF3D7_0831900 (gen flanqueante upstream). Un menor porcentaje del 10.1% (23/227) presentó delección conjunta de *pfhrp2*,

PF3D7_0831700 y PF3D7_0831900. Otros perfiles genéticos incluyen delección de *pfhrp2* con presencia de ambos genes flanqueantes (8.8%). Con respecto a la delección del gen *pfhrp3*, se observa que el perfil más común fue la ausencia del gen PF3D7_1372100 (22.9%). En menor porcentaje, se observó que el gen downstream PF3D7_1372400 (6.2%) también se encuentra delecionado. Así mismo, se observa la ausencia del gen *pfhrp3* con presencia de ambos genes flanqueantes en el 15% (34/227) del total de muestras (Tabla 04).

Tabla 04. Perfiles de delección de *pfhrp2*, *pfhrp3* y genes flanqueantes de *P. falciparum* en 227 muestras

| Comunidad de estudio | Cahuide | San José de Lupuna | Santa Emilia |
|---|-------------|--------------------|--------------|
| Variable | | | |
| Número de muestras | 76 | 58 | 93 |
| Perfil <i>pfhrp2</i> (PF3D7_0831700, <i>pfhrp2</i>, PF3D7_0831900) | | | |
| + + + | 81 (35.7%) | | |
| + — — | 71 (31.3%) | | |
| — — — | 23 (10.1%) | | |
| + — + | 20 (8.8%) | | |
| + + — | 17 (7.5%) | | |
| — — + | 8 (3.5%) | | |
| — + + | 4 (1.8%) | | |
| — + — | 3 (1.3%) | | |
| Perfil <i>pfhrp3</i> (PF3D7_1372100, <i>pfhrp3</i>, PF3D7_1372400) | | | |
| + + + | 104 (45.8%) | | |
| — — + | 52 (22.9%) | | |
| + — + | 34 (15%) | | |
| — — — | 14 (6.2%) | | |
| + — — | 10 (4.4%) | | |
| — + + | 8 (3.5%) | | |
| + + — | 3 (1.3%) | | |
| — + — | 2 (0.9%) | | |

+: Presencia del gen

—: Ausencia del gen

PF3D7_0831700: Gen HSP-70

PF3D7_0831900: Gen PHIST-x
PF3D7_1372100: Gen PHIST-b
PF3D7_1372400: Gen acyl-CoA
sintetasa

7.4 Genotipificación multilocus de las muestras de *P. falciparum*

7.4.1 Identificación y selección de marcadores microsatélites

Se identificaron y seleccionaron diversos marcadores microsatélites (STRs) de *P. falciparum*, distribuidos en los catorce cromosomas. El primer panel de 11 marcadores neutrales descritos por Anderson *et al.*, 1999 fue seleccionado en base a su previo uso en estudios de genotipificación de aislados provenientes de la Amazonía Peruana [38]. En el segundo grupo de nuevos marcadores, se utilizó la base de datos del NCBI (Sub-base de datos: “Probe”, palabra clave: “*STS falciparum*”). En base a los resultados de la búsqueda, se seleccionaron 9 microsatélites. De estos nueve microsatélites, se consideró el motivo de repetición dinucleotida, los cuales son los más abundantes y conservados en organismos eucariotes y mejor representados en estudios de estructura poblacional local de malaria [63; 70]; y una distancia entre dos marcadores de un mismo cromosoma, mayor a 15 kb y una diferencia de T_m entre pares de primers menor a 5°C. Mediante el programa Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), se evaluó cada par de cebadores y su especificidad de amplificación en la cepa de referencia *Plasmodium falciparum*

(taxid:5833). Las características de cada loci se describen detalladamente en **Anexo 07**.

7.4.2 Estandarización de PCR de veinte marcadores microsatélites

La amplificación de los marcadores microsatélites neutrales desarrollados por Anderson *et al.*, 1999 [65, 66] fueron amplificados en la cepa de referencia ITG de *P. falciparum* por PCR convencional y sus variantes (**Tabla 05**). Además, la amplificación del nuevo panel de microsatélites incluyó el uso de PCR convencional y PCR tipo nested. El límite de detección de amplificación fue ajustado a 2 copias del gen por reacción de PCR.

Tabla 05. Condiciones de PCR y variantes de PCR en la estandarización de microsatélites en la cepa de referencia ITG de *P. falciparum*

| Microsatélite | Temperatura de hibridación | Tipo de PCR |
|--------------------------------|----------------------------|--------------|
| ARA2 TA60 Pfg377 TA87 | 47° C | Convencional |
| TAA42 C1M8 | 50° C | |
| 2490 PfPK2 TA24 | 52° C | |

| Microsatélite | Temperatura de hibridación | Tipo de PCR |
|---------------|----------------------------|-------------------|
| TA81 | - | Nested |
| PolyA | - | Nested |
| B7M66 | - | Nested |
| B5M63 | - | Nested |
| C2M22 | - | Nested |
| C2M21 | - | Nested |
| XB8M30 | - | Nested |
| KAHRP | - | Nested |
| TA1 | - | Nested modificado |
| XB8M6 | 47° C | Convencional |
| Pf2802 | 50° C | |

La presencia de una banda única mostró un resultado positivo de amplificación por PCR para cada marcador microsatélite (**Figura 07**). Así mismo, el tamaño de los alelos para cada marcador fue estimado con el programa Genemapper v.4.0. Todos los tamaños de los productos de amplificación corresponden a los ya reportados en la literatura o determinados por Primer-BLAST para la secuencia de la cepa de referencia ITG (**Tabla 06**).

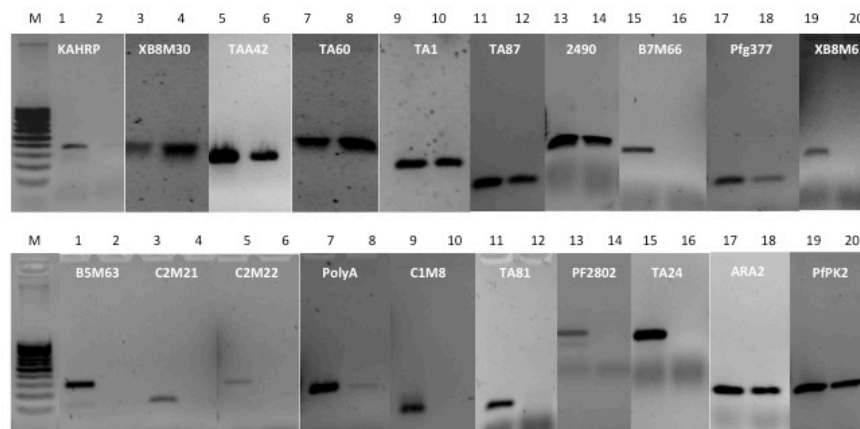


Figura 07. Identificación del producto de amplificación de 20 marcadores microsatélites en la cepa de referencia ITG de *P. falciparum* en gel de agarosa 2%. M=Marcador de peso molecular 25 bp (Invitrogen); Carriles 1,3,5,7,9,11,13,15,17 y 19 a una concentración de ADN de 2000 copias/reacción; Carriles 2,4,6,8,10,12,14,16,18 y 20 a una concentración de ADN de 20 copias/reacción.

Tabla 06. Tamaño de alelos estimado por electroforesis capilar en la cepa de referencia ITG de *P. falciparum* analizado con el program Genemapper v.4.0

| Microsatélite | Primer Fwd (5'-3') | Primer Rev (5'-3') | Tamaño en bp | Fluoróforo |
|---------------|-------------------------|------------------------|--------------|------------|
| ARA2 | GAATAAACAAAGTATTGCT | GCTTTGAGTATTATTAATA | 68 | PET™ |
| TA60 | CTCAAAGAAAAATAATTCA | AAAAAGGAGGATAAATACAT | 162 | NED™ |
| TAA42 | GTATTATTACTACTACTAAAG | ACAAAAGGGTGGTGATTCT | 253 | VIC™ |
| C1M8 | AGTATTATTATTACCACTACT | GAAGGCTAATACAATTGGTA | 159 | NED™ |
| PfG377 | GATCTCAACGGAAATTAT | TTATCCCTACGATTAACA | 107 | PET™ |
| TA87 | AATGGCAACACCATTCAAC | ACATGTTTCATATTACTCAC | 118 | PET™ |
| 2490 | GCAGCACAAAAAGAAATAC | GACGAATTATTAGAATGTCTG | 151* | PET™ |
| PfPK2 | CTTTCATCGATACTACGA | AAAGAAGGAACAAGCAGA | 156 | FAM™ |
| TA1 | CCGTCATAAGTGCAGAGC | TTTTATCTTCATCCCCAC | 196 | NED™ |
| TA81 | TGGACAAATGGGAAAGGATA | TTTCACACAACACAGGATT | 100 | PET™ |
| POLYA | AAAATATAGACGAACAGA | ATCAGATAATTGTTGGTA | 197 | NED™ |
| XB8M6 | CTTCATTTCTTTAATAACTTGT | AGGATATGTAGAACTATAAAA | 121 | FAM™ |
| XB8M30 | TTTTCACAGATACATAAATA | ATTACAAAATGATTCCACAC | 164 | FAM™ |
| PF2802 | ATATGTATAAAAAGGAAATACC | GATATACCCTCAGAGAAAT | 183 | NED™ |
| TA24 | CAAACATAATTCCTTTACTGTGT | AGGTTTTCTTTTACATCCAGCA | 204 | VIC™ |
| B7M66 | TATATTTTTACAGGTTGTAT | ACAGGAATAAATGGATATG | 231 | VIC™ |
| B5M63 | ATATCTTTTTAGAAATGTTGC | TCGTCTAATTTCCATTCCAT | 259 | VIC™ |
| C2M22 | AAAGGTTACCAAAATTCTAAAA | AAACATGAATCATAGAGAAAA | 258 | VIC™ |
| C2M21 | TGCCATTTCTTATACATACCA | TTTTCTGTTGCATTGTAATA | 174 | FAM™ |
| KAHRP | ACTCTTTTCTGTATAAACGTC | TTTATTAAGACGTATTTAAGCA | 172 | FAM™ |

***NOTA:** El producto del satélite 2490 corresponde al producto de amplificación de una reacción de nested externa a diferencia del producto de 84 bp reportado por Anderson *et al.*, 1999 proveniente de una reacción de nested interna.

7.4.3 Amplificación de microsatélites en muestras de *P. falciparum*

De un total de 182 muestras exitosamente reamplificadas por la metodología de reamplificación de genoma completo (*WGA*), se amplificó un total de 20 marcadores microsatélites. A continuación, se muestra en la eficiencia de amplificación de PCR de los 20 marcadores en las muestras de *P. falciparum* (**Figura 08**).

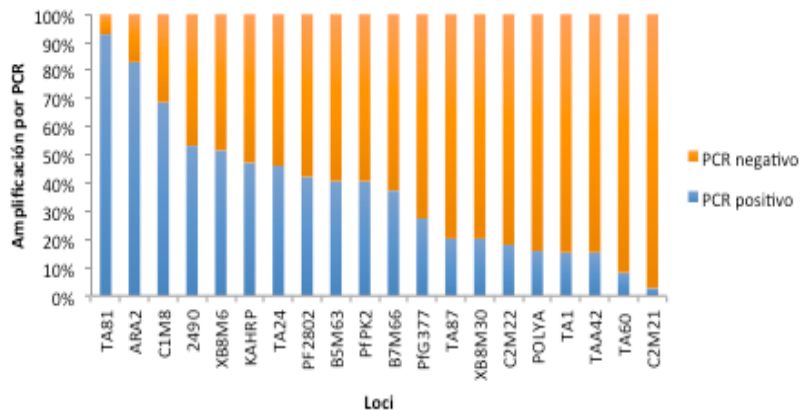


Figura 08. Eficiencia de amplificación de PCR de 20 marcadores microsatélites en 182 muestras reamplificadas de *P.falciparum*.

En términos generales, se observa una baja eficiencia de amplificación de los marcadores; donde solo 5 microsatélites presentan una eficiencia de amplificación (PCR positivo) mayor al 50% (ARA2, TA81, C1M8, 2490, XB8M6) en el total de muestras genotipificadas. En contraste, los 15 marcadores microsatélites restantes presentan una eficiencia de amplificación entre el 2.7% - 47.3%. Esta baja eficiencia de amplificación puede ser explicada por una mutación del microsatélite en la zona de unión al primer. Se estimó el porcentaje de infecciones únicas o mixtas por *Plasmodium spp*, al presentar más de dos alelos diferentes para un mismo loci.

De este primer filtro, se estimó que el 92.3% (168/182) correspondían a infecciones únicas de *P. falciparum* y el 7.7% (14/182) a infecciones policlonales de *P. falciparum*. La localidad con mayor número de infecciones policlonales fue Cahuide (7/14); seguido de San José de Lupuna (5/14) y Santa Emilia registró el menor

número de este tipo de infección (2/14), posiblemente debido al aislamiento geográfico de dicha comunidad. Al eliminar aquellos marcadores microsatélites con un bajo porcentaje de eficiencia de amplificación, se escogieron 5 marcadores microsatélites (ARA2, C1M8, TA81, 2490 y KAHRP). Este nuevo criterio incluyó a 112 muestras de *P.falciparum*; de las cuales, el 25.9% (29/112) que provienen de la comunidad de Cahuide; el 22.32% (25/112) de San José de Lupuna y el 51.8% (58/112) de la comunidad de Santa Emilia (**Tabla 07**).

Tabla 07. Número de infecciones monoclonales y policlonales detectadas con marcadores microsatélites

| Tipo de infección | Cahuide | San José de Lupuna | Santa Emilia | Total | Número de marcadores utilizados |
|-------------------|---------|--------------------|--------------|--------------|---------------------------------|
| Monoclonal | 52 | 38 | 78 | 168 (92.30%) | 20 |
| Policlonal | 7 | 5 | 2 | 14 (7.70%) | |
| Monoclonal | 29 | 25 | 58 | 112 (100%) | 5 |

El análisis de diversidad y estructura poblacional fueron realizados con 5 marcadores microsatélites en un total de 112 muestras. El flujograma de muestras de *P. falciparum* que incluyen los criterios de inclusión/exclusión en la selección de muestras se especifica en la **Figura 09**.

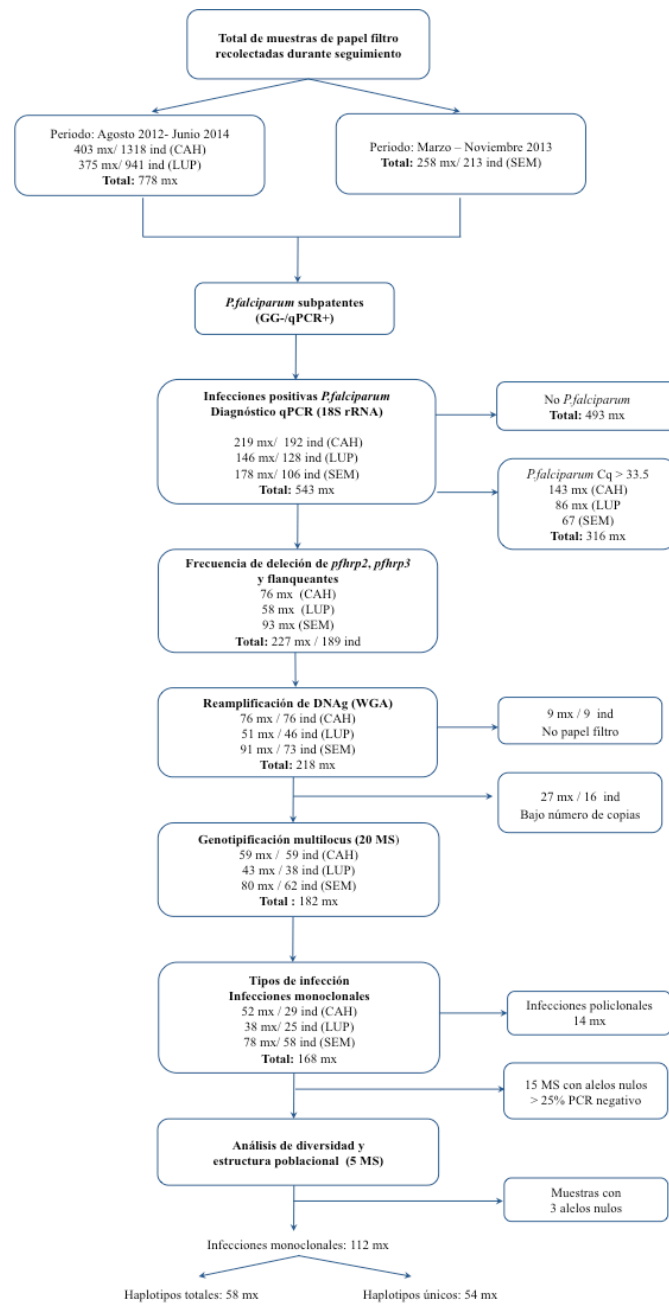


Figura 09. Flujograma de muestras de *P. falciparum* analizadas en este estudio.

El set de 5 marcadores microsatélites logró identificar un total de 19 alelos $19 (3.8 \pm 1.30)$ en 112 muestras de *P.falciparum*, con un rango de 3 (loci ARA2, 2490 y KAHRP) a 6 (locus C1M8) alelos. Además, la riqueza alélica se encuentra en el rango de 2.09 (locus ARA2) a 3.93 (locus C1M8), tal como se muestra en la **Tabla 08**. El tamaño de alelos reportados en este estudio es el esperado de acuerdo a estudios previos. En este estudio se reporta por primera vez el tamaño de alelos para el loci KAHRP.

Tabla 08. Características principales de cinco marcadores microsatélites en el estudio de diversidad genética y estructura poblacional en muestras de *P. falciparum*

| Locus * | Cromosoma | Nº acceso GenBank | Motivo de repetición | Número de alelos | Rango de tamaño en bp |
|---------|-----------|-------------------|-----------------------|------------------|-----------------------|
| C1M8 | 1 | G38013 | (AAT) ₉₋₁₂ | 6 | 180-203 |
| TA81 | 6 | AF010510 | (AAT) ₇₋₁₅ | 4 | 94-112 |
| 2490 | 10 | G37790.1 | (AAT) ₆₋₈ | 3 | 149-154 |
| ARA2 | 11 | X17484 | (AAT) ₉₋₁₂ | 3 | 61-71 |
| KAHRP** | 2 | J02972.1 | (TA) ₂₂ | 3 | 157-162 |

* Reportado por Anderson *et al.*, 1999

** Nuevo microsatélite en este estudio

7.5 Análisis de diversidad genética de *P. falciparum*

7.5.1 Frecuencias alélicas de cinco marcadores microsatélites

Los índices de diversidad genética fueron estimados a partir del cálculo de las frecuencias alélicas por localidad y frecuencias alélicas a nivel global de los cinco marcadores microsatélites con el programa GenAlEx v.6.5, mostrados en la **Tabla**

09. En la población total de *P. falciparum* se observa bajo número de alelos (entre 3 y 4) para los microsatélites ARA2, 2490 y TA81, es decir una baja variabilidad del parásito. El microsatélite más polimórfico es C1M8, el cual presenta 6 alelos.

Tabla 09. Distribución de las frecuencias alélicas de 5 marcadores microsatélites en la población total de *P.falciparum* de la Amazonía Peruana

| Loci | Alelo | Frecuencia alélica por localidad | | | Frecuencia alélica global |
|-------|-------|----------------------------------|--------------------|--------------|---------------------------|
| | | Cahuido | San José de Lupuna | Santa Emilia | |
| ARA2 | 61 | 0.179 | 0.043 | 0.000 | 0.058 |
| | 65 | 0.786 | 0.957 | 1.000 | 0.932 |
| | 71 | 0.036 | 0.000 | 0.000 | 0.010 |
| C1M8 | 180 | 0.348 | 0.286 | 0.385 | 0.349 |
| | 183 | 0.043 | 0.143 | 0.000 | 0.048 |
| | 186 | 0.435 | 0.571 | 0.615 | 0.554 |
| | 188 | 0.043 | 0.000 | 0.000 | 0.012 |
| | 200 | 0.087 | 0.000 | 0.000 | 0.024 |
| | 203 | 0.043 | 0.000 | 0.000 | 0.012 |
| TA81 | 94 | 0.889 | 0.870 | 0.017 | 0.417 |
| | 98 | 0.111 | 0.087 | 0.448 | 0.287 |
| | 107 | 0.000 | 0.043 | 0.000 | 0.009 |
| | 112 | 0.000 | 0.000 | 0.534 | 0.287 |
| 2490 | 149 | 0.053 | 0.000 | 0.000 | 0.011 |
| | 151 | 0.895 | 0.600 | 0.531 | 0.625 |
| | 154 | 0.053 | 0.400 | 0.469 | 0.364 |
| KAHRP | 157 | 0.929 | 0.647 | 0.532 | 0.628 |
| | 160 | 0.000 | 0.000 | 0.043 | 0.026 |
| | 162 | 0.071 | 0.353 | 0.426 | 0.346 |

7.6 Diversidad genética intrapoblacional de *P. falciparum*

El análisis de diversidad genética intrapoblacional de *P. falciparum* estimado con un limitado número de cinco marcadores microsatélites nos sugeriría una baja diversidad genética, los índices de heterocigosidad esperada (H_e) varían entre 0.15 a 0.60 (**Tabla 10**).

Tabla 10. Heterocigosidad esperada (H_e) calculado en 112 muestras de *P. falciparum*

| Locus | Nº de alelos | He | Riqueza alélica | Comunidad | Diversidad genética (H) |
|----------|--------------|------|-----------------|-----------|-------------------------|
| ARA 2 | 3 | 0.15 | 2.09 | CAH | 0.32 |
| C1M8 | 6 | 0.60 | 3.93 | LUP | 0.38 |
| TA81 | 4 | 0.33 | 3.24 | SEM | 0.41 |
| 2490 | 3 | 0.41 | 2.29 | | |
| KAHRP | 3 | 0.39 | 2.55 | | |
| Promedio | 3.8 | 0.38 | 2.82 | Promedio | 0.37 |

Al comparar los valores de diversidad genética intrapoblacional entre comunidades de estudio, se observa que la diversidad genética (H) es de 0.32. El índice de diversidad genética es la más baja en la comunidad de Cahuide; mientras que en San José de Lupuna es de 0.38 y finalmente para Santa Emilia, se encuentra el valor más alto de 0.41. La baja heterocigosidad encontrada en este estudio son similares a estudios previos donde utilizan microsatélites en zonas de baja transmisión de malaria.

7.7 Diversidad genética interpoblacional de *P. falciparum*

Los valores de F_{st} standardized [84] de *P. falciparum* entre pares de comunidades de estudio fueron calculados con el programa Fstat v.2.9.3 y corregidos con el programa RecodeData [87] para determinar si existe diferenciación genética entre estas localidades. Se observa en la **Tabla 11** que existe una gran diferenciación genética entre Cahuide- Santa Emilia ($F_{st} = 0.50$; $p < 0.01$) y San José de Lupuna- Santa Emilia ($F_{st} = 0.35$; $p < 0.01$), expresados como una gran diferenciación genética. Por el contrario, el valor de F_{st} es menor entre Cahuide- San José de Lupuna ($F_{st} = 0.11$; $p < 0.01$), expresado como una moderada diferenciación genética de acuerdo a la clasificación de valores de F_{st} propuesto previamente [86]. Estos resultados confirman que no existe una diferenciación genética de *P. falciparum* en la Amazonía Peruana puesto que los valores no sobrepasan el 50%.

Tabla 11. Comparación de la diversidad genética interpoblacional (Estadístico F_{st}) en muestras de *P. falciparum* de tres comunidades de la Amazonía Peruana

| | F_{st} | | |
|-----|----------|------|------|
| | CAH | LUP | SEM |
| CAH | | 0.11 | 0.50 |
| LUP | 0.11 | - | 0.35 |
| SEM | 0.50 | 0.35 | - |

Niveles de diferenciación genética para cada comparación entre pares de poblaciones por comunidad de estudio. Todos los valores fueron significativamente diferentes de 0 (* $p < 0.001$).

7.10 Desequilibrio de ligamiento global de *P. falciparum*

El desequilibrio de ligamiento fue medido según el índice de asociación en la población total de *P. falciparum*. Este test fue calculado bajo la hipótesis nula de la existencia de equilibrio de ligamiento. Un valor alto de desequilibrio de ligamiento, es interpretado que la población analizada no presenta eventos de recombinación, es decir, presenta un comportamiento tipo clonal. Esta característica ha sido comúnmente descrita en zonas de baja transmisión utilizando marcadores microsatélites. El desequilibrio de ligamiento fue estimado considerando muestras con haplotipos completos (con alelos no amplificados). Además, se realizó el mismo análisis con haplotipos únicos (sin alelos no amplificados) puesto que el programa LIAN v3.5 [90] considera la presencia de “missing data” como alelos reales, de tal manera que se evitó el sesgo. Según lo muestra la **Tabla 12**, el desequilibrio de ligamiento es alto ($I_A^S = 0.158$; $p < 1.00 \times 10^{-3}$) y estadísticamente significativo al analizar la población total de *P. falciparum* (muestras con haplotipos completos). El desequilibrio de ligamiento es más alto en la comunidad de SEM ($I_A^S = 0.220$; $p < 1.00 \times 10^{-3}$) en comparación a LUP y CAH ($I_A^S = 0.176$ y $I_A^S = 0.107$; $p < 1.00 \times 10^{-3}$).

Tabla 12. Análisis de desequilibrio de ligamiento de *P. falciparum* en la Amazonía Peruana

| Población | Muestra (n) | Haplotipos totales | | | | Haplotipos completos | |
|-----------|-------------|--------------------|-------|---------|-------------------|----------------------|---------|
| | | V_D | V_e | I_A^S | $\text{Var}(V_D)$ | Muestra (n) | I_A^S |
| Total | 112 | 2.779 | 1.003 | 0.158* | 0.002 | 59 | 0.041 |
| CAH | 29 | 1.558 | 0.601 | 0.107* | 0.041 | 18 | -0.025 |
| LUP | 25 | 2.291 | 0.750 | 0.176* | 0.013 | 17 | 0.176 |
| SEM | 58 | 3.189 | 0.999 | 0.220* | 0.003 | 24 | -0.005 |

V_D = varianza; V_e = varianza esperada cuando se cumple el equilibrio de ligamiento; I_A^S = índice de asociación estandarizada; $\text{Var}(V_D)$ = hipótesis nula si $V_D = V_e$. *Valor de $p < 0.0001$ estimado con 10000 permutaciones de Cadenas de Markov y Monte Carlo (MCMC).

El índice estandarizado de asociación (I_A^S) mide la extensión del equilibrio de ligamiento dentro de una población al detectar asociación entre alelos de diferentes loci. Si existe equilibrio de ligamiento debido a eventos frecuentes de recombinación, el valor esperado de I_A^S es cero. En contraste, si el parásito presenta una estructura tipo clonal debido a un aislamiento geográfico o eventos pocos frecuentes de recombinación (inbreeding), el valor esperado de I_A^S se desvía significativamente de cero [113]. En este estudio, los valores de I_A^S (Tabla 12) fueron significativamente diferentes de cero. Al analizar los haplotipos completos, el valor de desequilibrio de ligamiento disminuyó cuando se analizaron las muestras con haplotipos únicos. En la población total, el desequilibrio de ligamiento disminuyó a $I_A^S = 0.041$ ($p < 1.00 \times 10^{-3}$). Solo en LUP se mantuvo el desequilibrio de ligamiento con un valor de $I_A^S = 0.176$ ($p = 5.00 \times 10^{-3}$). Solo dos excepciones fueron las comunidades de CAH y SEM, con un valor de I_A^S negativo y no significativo

($p > 0.05$). En conjunto, estos resultados evidenciarían que *P.falciparum* en las comunidades de estudio presenta una estructura poblacional de tipo clonal.

7.9 Determinación de haplogrupos de *P.falciparum*

Tomando en consideración 112 muestras de infección monoclonal, 54 muestras presentaron data completa para los cinco marcadores. En este grupo, se determinaron los haplotipos únicos con el programa HAPLOTYPE ANALYSIS v.1 [91], resultando en la estimación de “haplogrupos” y su respectiva frecuencia alélica (Tabla 13).

Tabla 13. Determinación de 8 haplotipos completos basado en cinco microsatélites en 52 muestras de *P. falciparum*

| N° muestras | Haplotipo | Haplogrupo | Perfil | | CAH | LUP | SEM |
|-------------|--------------------|------------|---------------|---------------|-------------|-------------|-------------|
| | | | <i>Pfhrp2</i> | <i>Pfhrp3</i> | | | |
| 16 | 65 186 94 151 157 | Haplo-5 | + | + | 0.82 | 0.64 | 0.00 |
| 14 | 65 186 112 151 157 | Haplo-3 | + | + | 0.00 | 0.00 | 0.47 |
| 12 | 65 180 98 154 162 | Haplo-2 | - | - | 0.00 | 0.00 | 0.40 |
| 5 | 65 180 94 154 162 | Haplo-1 | - | - | 0.09 | 0.36 | 0.00 |
| 2 | 65 186 98 154 162 | Haplo-7 | | | 0.00 | 0.00 | 0.07 |
| 1 | 65 186 112 154 157 | Haplo-4 | | | 0.00 | 0.00 | 0.03 |
| 1 | 65 186 98 154 157 | Haplo-6 | | | 0.00 | 0.00 | 0.03 |
| 1 | 65 188 94 149 157 | Haplo-8 | | | 0.09 | 0.00 | 0.00 |

En la población de estudio, se determinó la presencia de 8 haplogrupos en base a cinco marcadores de *P.falciparum* en aquellas muestras con haplotipos completos. Los haplotipos “Haplo-1”, “Haplo-2”, “Haplo-3” y “Haplo-5” presentaron una mayor frecuencia alélica (> 0.36) con respecto a los otro cuatro haplogrupos “H4”,

“H6”, “H7” y “H8”, que presentaron unicamente dos o una muestra. Se observa que los haplogrupos no son compartidos entre las comunidades, a excepción del “*Haplo-5*”, sugiriendo la presencia de un haplogrupo común en las comunidades de Cahuide y San José de Lupuna.

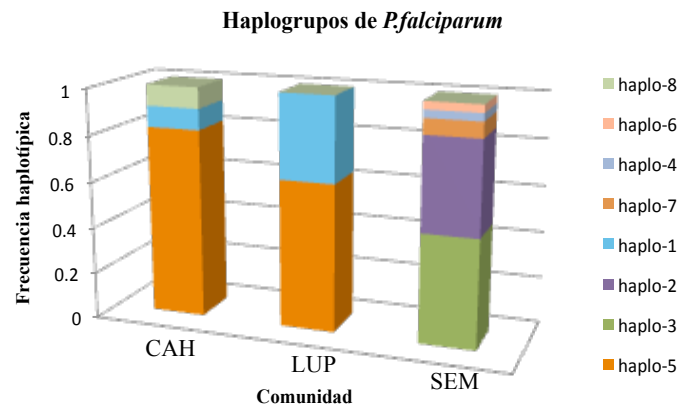


Figura 11. Frecuencias alélicas de 8 haplogrupos basado cinco marcadores microsatélites de *P. falciparum* por comunidad de estudio

En el caso particular de la comunidad de Cahuide, la presencia del haplogrupo “*Haplo-5*” tiene una alta frecuencia alélica de 0.82; mientras que para San José de Lupuna están presentes tanto “*Haplo-1*” y “*Haplo-5*” con una frecuencia alélica moderada de 0.36 y 0.64, respectivamente. La comunidad de Santa Emilia posee dos haplogrupos diferentes a las otras comunidades, “*Haplo-2*” y “*Haplo-3*” con frecuencia alélica moderada de 0.40 y 0.47 para cada haplogrupo.

7.10 Determinación de la estructura poblacional de *P. falciparum*

La estructura poblacional de *P. falciparum* fue determinada usando el programa Structure, basado en Inferencia Bayesiana. Para el análisis, se consideraron únicamente las muestras monoclonales con datos completos o incompletos hasta en tres marcadores. Del análisis exploratorio, no se consideró ninguna información *a priori*. En el primer análisis de la población total (n=112), se observa un valor de *cluster* de $K=2$ asociado al mayor valor de delta K (ΔK : 156.81), seguido de un segundo valor de $K=4$ (ΔK : 29.26).

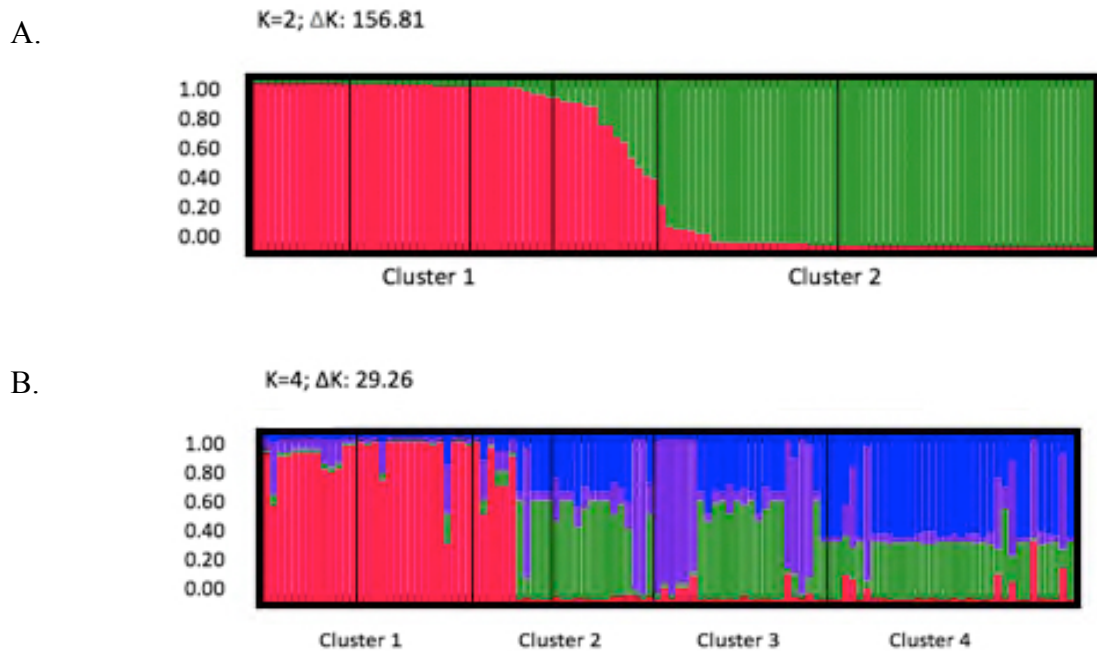


Figura 12. Determinación de la estructura poblacional putativa de *P. falciparum* en la Amazonía Peruana. La inferencia de clusters indica la presencia de dos grandes clusters $K=2$; (ΔK : 156.81) y $K=4$; (ΔK : 29.26) de *P. falciparum* (Panel A y B respectivamente) El eje Y representa la proporción de membresía (coeficiente Q) del individuo hacia cada cluster. Representación gráfica obtenido en Distruct v.1.1.

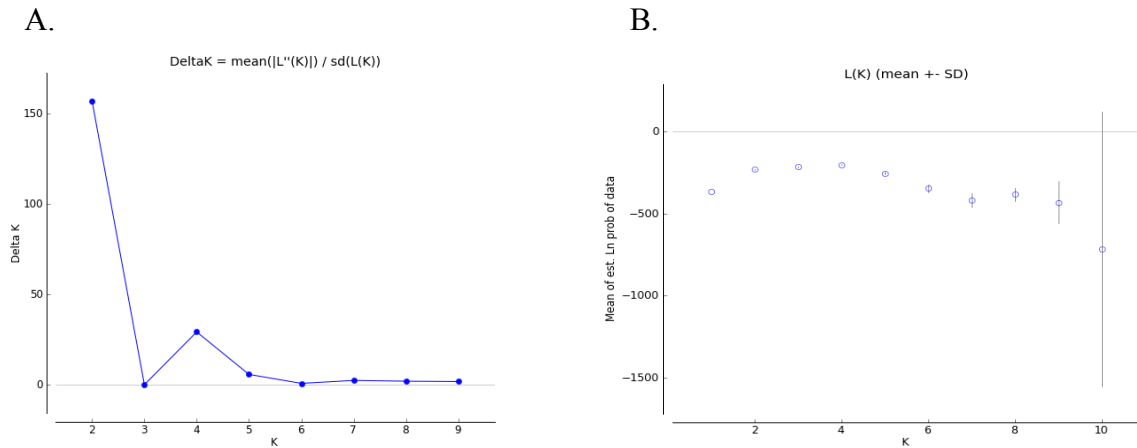
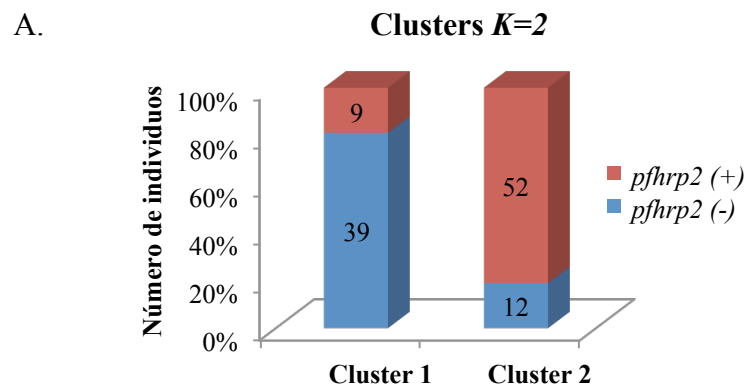


Figura 13. Representación gráfica de la probabilidad estimada para cada valor de K en la estructura poblacional de *P. falciparum*. Panel A: Estimación del valor de delta K calculado por el método de Evanno et al (2005). El máximo valor se encuentra en $K=2$ (ΔK : 156.81), seguido de $K=4$ (ΔK : 29.6). Panel B: Valores de la media y varianza del valor de probabilidad estimada para cada valor de K .

Según la **Figura 14**, se observa que la población total se divide en un primer grupo denominado “*Cluster 1*” (51/112 muestras) y en un segundo grupo “*Cluster 2*” (61/112), con un valor promedio de Q_{ind} de 0.925 y 0.939, respectivamente. Estos clusters, a su vez están conformados por los genotipos de *Pfhrp2*: donde el cluster 1 está formado por parásitos *Pfhrp2*-; en contraste al cluster 2 formado por parásitos *Pfhrp2*+



B.

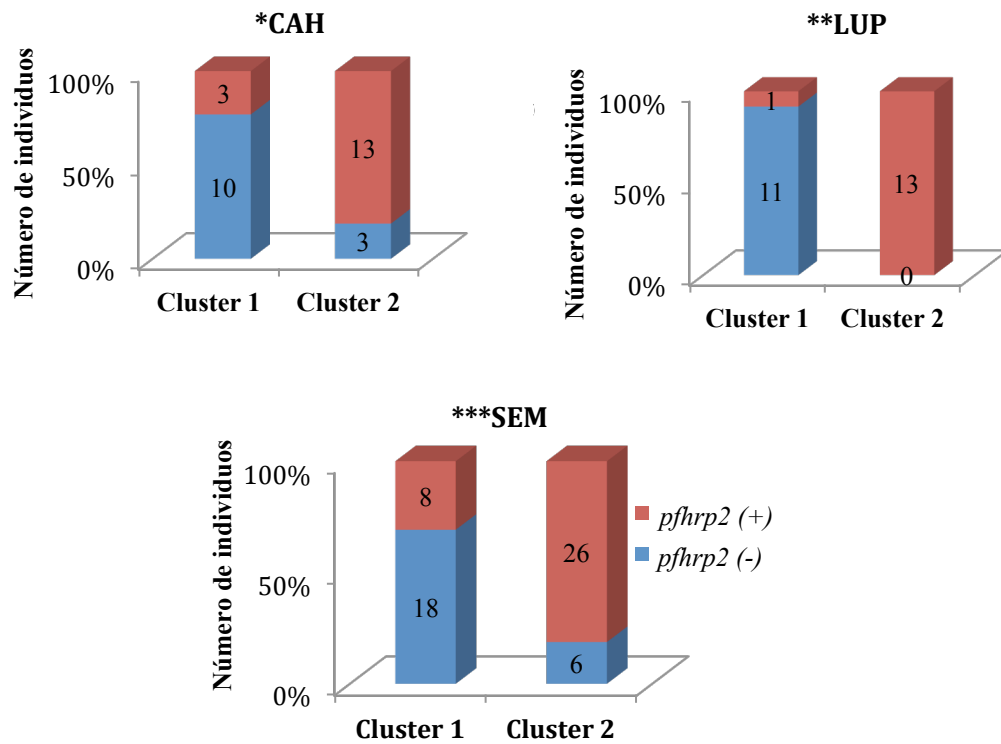
| K clusters | Individuos con genotipo | |
|--------------------|--------------------------------|-----------------------|
| | <i>Pfhrp2</i>- | <i>Pfhrp2</i>+ |
| Cluster 1 | 39 (81.25%) | 9 (18.75%) |
| Cluster 2 | 12 (18.75%) | 52 (81.25%) |
| Promedio Q_{ind} | 0.925 * | 0.931 * |
| DS | 0.098 | 0.104 |

*Diferencias estadísticamente significativas calculadas con la Prueba de X^2 cuadrado. Fisher= <0.001; X^2 = <0.01. Q_{ind} : valor de membresía individual; DS: desviación estándar.

Figura 14. Distribución de parásitos *Pfhrp2*- y *Pfhrp2*+ de *P. falciparum* en clusters poblacionales inferidos ($K=2$; ΔK : 156.81). A. Distribución de individuos según cluster poblacional inferido. B. Test de asociación del genotipo *Pfhrp2* con pertenencia al cluster poblacional.

La agrupación de individuos del cluster 1 involucra a 39 individuos *Pfhrp2*- (81.25%) en comparación a solo 9 individuos *Pfhrp2*+ (18.75%). El cluster 2 comprende a 52 individuos *Pfhrp2*+ (81.25%) y solo 12 individuos *Pfhrp2*- (18.75%). Las diferencias de proporciones de ambos clusters fueron estadísticamente significativas al realizar la prueba estadística de X^2 -cuadrado, $p<0.01$.

En las comunidades de estudio, se conserva el agrupamiento de los parásitos *Pfhrp2*- hacia el cluster 1, siendo esta característica más marcada en la comunidad de San José de Lupuna.



Diferencias estadísticamente significativas calculadas con Prueba de X^2 cuadrado:
 * Fisher= 0.003; $X^2 = 0.002$; ** Fisher < 0.001; $X^2 < 0.001$; *** Fisher < 0.001; $X^2 < 0.001$

Figura 15. Distribución de parásitos *Pfhrrp2*- y *Pfhrrp2*+ de *P. falciparum* en clusters poblacionales inferidos por comunidad de estudio ($K=2$; ΔK : 156.8).

VIII. DISCUSIÓN

El descubrimiento de cepas de *P. falciparum* que carecen de genes *pfhrp2* y *pfhrp3*, blancos importantes en las pruebas de diagnóstico rápido, fue descrito previamente en zonas cercanas a Iquitos, el principal foco de infección de malaria [10]. En dicho estudio retrospectivo, se determinó que la prevalencia de la delección en parásitos de *P. falciparum* era del 40% para *pfhrp2*; y del 70% para *pfhrp3* [10]. En este estudio, se describe por primera vez la frecuencia de las delecciones de *pfhrp2*, *pfhrp3* y sus genes flanqueantes en tres comunidades rurales de la Amazonía Peruana en el periodo 2012-2014. La alta frecuencia de delecciones encontradas en los genes *pfhrp2* (62%) y *pfhrp3* (62.1%) demostraría un alto número de parásitos que presentan esta delección. Además, este hallazgo brinda un mayor sustento a que las delecciones en genes ricos en histidina tipo 2 y 3 son más frecuentes en cepas silvestres de *P. falciparum* localizados en la región de Sudamérica [10, 12, 18, 17, 35]. Este mecanismo involucraría la delección preferencial del gen *pfhrp2* con el gen upstream PF3D7_0831900 (31.3% de frecuencia), lo cual es similar a estudios previamente reportados [17, 18]. Sin embargo, de este estudio no se puede determinar si el punto de quiebre cromosómico ocurre en la región exónica del gen *pfhrp2*, tal como se ha planteado anteriormente [100]. En la actualidad, no existe ningún estudio que reporte la delección en los genes flanqueantes a *pfhrp3* en los parásitos de las comunidades de la Amazonía Peruana. De esta manera, este estudio contribuye por primera vez en determinar la pérdida conjunta del gen *pfhrp3* y su gen flanqueante PF3D7_13372100 con una frecuencia de delección del 22.9%. La cercanía física del gen *pfhrp3* y de su

gen flanqueante PF3D7_1372100 en la region proximal al telómero explicaría el porqué ambos genes son delecionados preferencialmente [101]. Un hallazgo similar ha sido reportado en aislados clínicos provenientes de Honduras, con una frecuencia de deleción del 26.5% [35].

Otro hallazgo importante en este estudio es la deleción de *pfhrp2* y sus dos genes flanqueantes PF3D7_0831700 y PF3D7_0831900 en un 10.1% de muestras analizadas. Asi mismo, se reporta en menor proporción la deleción de *pfhrp3* y sus dos genes flanqueantes PF3D7_1372100 y PF3D7_1372400 en un 6.2%. Este resultado indicaría que existe una amplia región de ADN inestable en el subtelómero [34]. Por otro lado, los perfiles analizados en este estudio revelan que ciertos parásitos conservan el gen *pfhrp2* o *pfhrp3* y únicamente pierden los genes flanqueantes a *pfhrp2* y *pfhrp3* (1.3% y 0.9%, respectivamente), lo cual puede ser atribuido a eventos de recombinación entre parásitos de *Plasmodium spp* genéticamente diferentes durante fase sexual en el mosquito vector [103]. Estudios previos sugieren que el parásito de malaria utiliza rearrreglos cromosómicos, donde las deleciones de secuencias de ADN juegan un rol importante, incrementando sus probabilidades de supervivencia y dispersión en su hospedero definitivo [104]. En la actualidad, se desconoce si las deleciones de genes *pfhrp2*, *pfhrp3* y genes flanqueantes juegan un rol importante en la patogénesis de malaria severa.

Los microsatélites de *P. falciparum* han sido ampliamente utilizados en estudios de mapeo genético, estudios de asociación, resistencia a drogas, estudios de cruzamiento entre cepas de laboratorio genética de poblaciones, entre otros [52, 53]. La principal importancia de los microsatélites como marcadores moleculares es que no se encuentran bajo presión de selección y son de sumo interés en la genética poblacional de *Plasmodium spp* [42]. La aplicación directa del uso de estos marcadores permiten un mejor entendimiento de la epidemiología molecular de malaria en el contexto de la eliminación de la malaria [37, 42, 69, 70, 77].

Un avance importante en este estudio fue la estandarización de la genotipificación multilocus de nuevos marcadores, sin embargo muchos de ellos no lograron amplificar en las cepas silvestres de *P. falciparum*. Por el contrario, cuatro (ARA2, C1M8, 2490, TA81) de los marcadores previamente reportados sí amplificaron en las muestras de este estudio, y algunos de ellos han sido utilizados para responder preguntas de diversidad genética presente en poblaciones naturales de *P. falciparum*, en particular en zonas de baja transmisión [38, 41, 64, 65, 106-108]. El tamaño de los alelos corresponde a lo previamente reportado en la literatura [11, 18, 35, 38, 44, 99, 106-108].

Consistente a otros estudios en zonas de transmisión hipoendémica, un limitado número de alelos fue detectado para este panel de microsatélites [35, 38, 44, 99, 111-113]. A excepción del marcador C1M8, en el cual se encontraron seis alelos, similar a

un estudio realizado en Filipinas [108] conocido como área de baja transmisión de malaria. De los nueve microsatélites propuestos en este estudio, se logró la estandarización por PCR convencional en la cepa de laboratorio ITG, con una alta sensibilidad (20 copias/reacción). Algunos de los factores que podrían explicar la baja eficiencia de amplificación en muestras recolectadas de *P. falciparum* se debe principalmente a la baja carga parasitaria de los pacientes en Amazonía de este estudio, conllevando a que estas infecciones sean de tipo subpatente (PCR negativo/qPCR positivo), tal como se determinó inicialmente en la diagnóstico de la enfermedad. Otro factor es la variabilidad de los parásitos locales en la región de unión de los primers usados por lo no obtuvimos amplificación Además la presencia de alguna mutación en la region 3' de unión al primer debido a la variabilidad *per se* en la secuencia del ADN. No se descarta alguna inhibición ocasionada por los primers hexámeros del producto de la reamplificación genómica en las muestras.

P.falciparum es un parásito que exhibe un rango amplio de características a nivel genético-poblacional, el cual están aparentemente correlacionados con los niveles de endemicidad e intensidad de la transmisión en una zona geográfica [38]. De los índices de diversidad genéticos analizados, se observa que existe una baja heterocigosidad esperada ($H_e = 0.3-0.4$), concordante con lo encontrado en estudios previos en Honduras, Perú, Haití, Brazil, Ecuador y Panamá [44, 50, 109-113]. Se observa además un alto número de infecciones monoclonales (92.3%), un significativo desequilibrio de ligamiento y un reducido número de haplotipos

circulantes. El desequilibrio de ligamiento fue altamente significativo en las tres comunidades, al analizarse los haplotipos totales, sin embargo estos resultados solo se obtuvieron con cinco marcadores y a futuro se requiere de un nuevo análisis con un mayor número de microsatélites . En terminos generales, la existencia de un fuerte linkage disequilibrium corresponde a zonas de baja endemicidad y viceversa es concordante con lo reportado por otros autores [19, 35, 38, 44, 45, 49, 110].

Al realizarse un segundo análisis solo con haplotipos únicos de cada población, se observó que el valor de I_A^S disminuyó en la población total y en las comunidades de Cahuide y Santa Emilia ($P>0.05$). Solo en la comunidad de Lupuna el desequilibrio de ligamiento se mantuvo significativo ($P<0.05$). Esta disminución en el valor del desequilibrio de ligamiento se debe a que en la población existen varias cepas con el mismo haplotipo (también denominados “clones”). Este resultado se debe a que en las poblaciones existen varios parásitos con el mismo haplotipo o también llamados “clones”. Es posible distinguir a las poblaciones clonales de las poblaciones epidémicas [114], tratando a los “clones” como un solo individuo y analizando nuevamente el linkage disequilibrium. La disminución de los valores de linkage disequilibrium en CAH y SEM explicarian la presencia de “clones”, que presentaria una estructura tipo epidémica, lo cual es concordante con lo reportado en Sudamérica, donde el patrón de diversidad del parásito es explicado por la presencia de poblaciones epidémicas de *P. falciparum*, que conllevan a una expansión clonal [111-113]. Entre los factores que promueven la expansión epidémica se encuentra la

presencia haplotipos con ciertas ventajas o a un efecto fundador al inicio de la temporada de transmisión de la enfermedad, o ambos [48].

Con respecto a la diferenciación genética interpoblacional, se observó que los valores de F_{st} oscilaron entre 0.11 y 0.50 ($p < 0.01$). La mayor diferenciación genética observada fue encontrada entre Cahuide y Santa Emilia ($F_{st} = 0.50$), indicando que el 50% de la diversidad genética es explicada por diferencias a nivel poblacional. A pesar de que nuestros datos son limitados a cinco marcadores, este grado de diferenciación de *P. falciparum* se asemeja a un reciente estudio, en el cual analizaron la diversidad de *P. falciparum* de Malasia mediante técnicas moleculares como el 'deep sequencing', afirmando que los índices de fijación tienden a incrementar cuando la transmisión de malaria es baja [117]. Este último hecho también ha sido confirmado en la población de *P. falciparum* de Nicaragua, una zona de baja transmisión y en camino a la eliminación de malaria [44]. Otros estudios han propuesto que existe variación a nivel espacial en poblaciones de *Plasmodium*, indicando el grado de flujo génico entre diferentes localidades [118]. Los niveles más bajos de diferenciación genética se encontraron entre Cahuide y San José de Lupuna, los cuales se encuentran más cercanos geográficamente y que sean similares puede explicarse debido al elevado flujo génico entre ambas, tendiendo a homogenizar la variación genética.

Diversos estudios han demostrado que existe una diferenciación genética sustancial del parásito entre continentes [117], entre países [119, 123], incluso dentro de un mismo país [66, 118, 124]. En países de baja endemicidad tales como Malasia, se ha estimado que *P. falciparum* presenta diferenciación genética ($F_{st}= 0.24$), la cual fue evaluada con 10 microsatélites [117]. La constante movilidad de los pobladores debido a actividades socioeconómicas y culturales hacen posible la dispersión del parásito entre las diversas comunidades rurales y remotas de la Amazonía [125]. No se descarta que la diversidad intrapoblacional esté sobre-estimada por el bajo número de parásitos genotipificados en cada comunidad.

Una interpretación de esta diferenciación genética entre comunidades fue explicada mediante la determinación del número de clusters obtenido por Inferencia Bayesiana [92, 93]. Con la limitada información obtenida con nuestros cinco marcadores analizados, el número más probable de clusters fue de $K=2$ (con el valor delta K más alto de 156.81), seguido de un valor de $K=4$ (con el valor de delta K de 29.6). Estos valores representan la presencia de dos grandes grupos, seguido de cuatro subgrupos en la población total de *P. falciparum*. El primer grupo (“Cluster 1”) está conformado por parásitos *Pfhrp2*⁻, es decir parásitos que presentan la delección en *pfhrp2*; y el segundo grupo (“Cluster 2”) conformado por parásitos *Pfhrp2*⁺. La presencia de los cuatro subgrupos correspondería a la presencia de los cuatro haplogrupos (“H1, H2, H3 y H5”) con mayor frecuencia (0.36-0.80) determinados en este estudio, los cuales se diferencian únicamente en una sola variante alélica entre H1 y H2; y entre H3 y

H5. Este patrón de estructuración con respecto a la delección de *pfhrp2* ha sido observado en la población de Colombia [17], donde la mayoría de parásitos delecionados en *pfhrp2* provenientes del departamento de Amazonas fueron asignados a un mismo cluster.

La estructuración poblacional en *P. falciparum* puede ser explicada por una expansión clonal en particular de los parásitos *pfhrp2* (-), compuesto por el haplogrupo “H1” (CAH y LUP) y haplogrupo “H2” (SEM), el cual solo se diferencia en el tamaño de un alelo para el microsatélite TA81 (94 vs 98, respectivamente), siendo una variación muy mínima para el set de cinco marcadores microsatélites empleados en este estudio. La expansión clonal de *P. falciparum* ha sido recientemente reportada, ocasionado ‘*outbreaks*’ epidemiológicos en zonas como Tumbes [126] y Cusco [113] en muestras analizadas de los años 2012 y 2013, periodo donde se reporta el resurgimiento de *P. falciparum* con una alta incidencia de casos en malaria en Loreto [2]. En particular, se tiene conocimiento que el linaje responsable de estos outbreaks es la cepa Bv1 originaria de Loreto, la cual ha sido caracterizado molecularmente en sus genes de resistencia a fármacos como cloroquina (*Pfcr1*), multi-drogo resistencia (*Pfmdr1*), pimetamina (*Pfdhfr*) y sulfadoxina (*Pfdhps*); además de presentar las delecciones en los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* [106]. La presencia del linaje Bv1 (basado en los microsatélites TA1, PolyA, PFK2, 2490, TA109, C2M34 y C3M69) ha sido reportada en cepas circulantes de Ecuador, Panamá y Perú [45, 111, 112].

En este estudio, no podemos determinar si el cluster formado por los parásitos *Pfhrp2* negativos corresponde al linaje Bv1, debido a la falla en la amplificación de los microsatélites neutrales. Por lo tanto, se requiere de una caracterización molecular más detallada de los genes de resistencia así como de la amplificación de dos marcadores microsatélites adicionales C2M34 y C3M69 [127] en las muestras analizadas de este estudio.

Cabe resaltar, que este estudio tiene como gran limitante el bajo número muestral que se logró analizar para la estimación de las deleciones en *pfhrp2* y *pfhrp3*; así como en la genotipificación multilocus debido al predominio de pacientes asintomáticos [130] con infecciones subpatentes en su mayoría (gota gruesa negativo/qPCR positivo). En este estudio no fue posible analizar las 316 infecciones de *P. falciparum* determinadas por qPCR, determinadas como ‘baja parasitemia’ por presentar un Cq mayor a 33.5 (menor a 20 copias/reacción). Por tal motivo, los resultados correspondientes a la frecuencia de deleción en *pfhrp2* y *pfhrp3* posiblemente se encuentren sesgados. Para conocer la representatividad del *n* muestral, se calculó la proporción de muestras analizadas (n=227) con respecto a la población total de muestras diagnosticadas por qPCR (n=543) (Anexo 04), obteniéndose un factor de 2.28. Esto indicaría que en el estudio existe una sobre-estimación de la variabilidad genética y estructuración poblacional, principalmente otorgado por los métodos experimentales, diseño del

estudio, bajo número de marcadores microsatélites empleados y la naturaleza de muestras subpatentes de malaria en la Amazonía [128, 131].

IX. CONCLUSIONES

- Existe una frecuencia del 53% y 48% de deleciones de los genes *pfhrp2* y *pfhrp3*, respectivamente en los parásitos de *P.falciparum* provenientes de tres comunidades de la Amazonía Peruana.
- En este estudio se reporta por primera vez la deleción del gen *pfhrp3* y de sus genes flanqueantes en muestras de *P.falciparum*. Asi mismo, se observa una deleción preferencial del gen *pfhrp3* y del gen flanqueante upstream PF3D7_1372100 con un 22.9% de frecuencia.
- La diversidad genética de *P.falciparum* en las muestras analizadas es limitada, con un significativo desequilibrio de ligamiento ($I_A^S = 0.158$, $p < 0.0001$) y una moderada diferenciación genética del parásito ($F_{st} = 0.11-0.50$, $p < 0.001$).
- El análisis de estructura poblacional de *P.falciparum* basado en 5 marcadores microsatélites sugiere la presencia de dos clusters, denominados “Cluster 1” y “Cluster 2”. Los parásitos con deleción en los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* están agrupados en el Cluster 1; mientras que los parásitos con presencia de los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* están agrupados en el Cluster 2.

X. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

- En este estudio se analizaron únicamente muestras subpatentes (GG-/qPCR+) de *P. falciparum*. Por lo tanto las conclusiones se limitan a este grupo de infecciones de malaria.
- No se logró analizar las muestras positivas de *P. falciparum* con un valor de Cq mayor a 33.5 debido a la baja cantidad de ADN.
- Se reporta una baja eficiencia de amplificación por PCR de los marcadores microsatélites de *P. falciparum*, limitándose a 5 marcadores microsatélites. Por lo tanto, existe una sobre-estimación de la diversidad y estructuración del parásito en este estudio.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. World Health Report (2015) World Malaria Report 2015.
2. Dirección General de Epidemiología. Bol Epidemiol. 2015 37-43
3. 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.
4. Bousema T, Okell L, Felger I, Drakeley C. Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. Nat Rev Microbiol. 2014 Dec;12(12):833-40
5. Wongsrichanalai C, Barcus MJ, Muth S, Sutamihardja A, Wernsdorfer WH. A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT). Am J Trop Med Hyg. 2007 Dec;77(6 Suppl):119-27.
6. Arróspide N, Flores R, Ruiz J. Evaluación de una prueba rápida para el diagnóstico de malaria en áreas endémicas del Perú. Rev Peru Med Exp Salud Publica 23(2), 2006
7. Rosas Aguirre AM, Llanos Zavalaga LF, Trelles de Belaunde M. Relación costo-efectividad del uso de pruebas rápidas para el diagnóstico de la malaria en la Amazonia peruana. Rev Panam Salud Publica. 2009;25(5):377-88
8. Baker J, Ho M-F, Pelecanos A, Gatton M, Chen N, Abdullah S, et al. Global sequence variation in the histidine-rich proteins 2 and 3 of *Plasmodium falciparum*: implications for the performance of malaria rapid diagnostic tests. Malar J. 2010;9:129.
9. Lee N, Baker J, Andrews KT, Gatton ML, Bell D, Cheng Q, et al. Effect of sequence variation in *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 on binding of specific monoclonal antibodies: Implications for rapid diagnostic tests for malaria. J Clin Microbiol. 2006 Aug;44(8):2773-8.
10. Gamboa D, Ho M-F, Bendezu J, Torres K, Chiodini PL, Barnwell JW, et al. A large proportion of *P. falciparum* isolates in the Amazon region of Peru lack *pfhrp2* and *pfhrp3*: implications for malaria rapid diagnostic tests. PLoS ONE. 2010;5(1):e8091.

11. Akinyi S, Hayden T, Gamboa D, Torres K, Bendezu J, Abdallah JF, et al. Multiple genetic origins of histidine-rich protein 2 gene deletion in *Plasmodium falciparum* parasites from Peru. *Sci Rep*. 2013;3:2797.
12. Maltha J, Gamboa D, Bendezu J, Sanchez L, Cnops L, Gillet P, et al. Rapid diagnostic tests for malaria diagnosis in the Peruvian Amazon: impact of *pfhrp2* gene deletions and cross-reactions. *PLoS ONE*. 2012;7(8):e43094.
13. Houzé S, Hubert V, Le Pessec G, Le Bras J, Clain J. Combined deletions of *pfhrp2* and *pfhrp3* genes result in *Plasmodium falciparum* malaria false-negative rapid diagnostic test. *J Clin Microbiol*. 2011 Jul;49(7):2694–6.
14. Koita OA, Doumbo OK, Ouattara A, Tall LK, Konaré A, Diakité M, et al. False-negative rapid diagnostic tests for malaria and deletion of the histidine-rich repeat region of the *hrp2* gene. *Am J Trop Med Hyg*. 2012 Feb;86(2):194–8.
15. Wurtz N, Fall B, Bui K, Pascual A, Fall M, Camara C, et al. *Pfhrp2* and *pfhrp3* polymorphisms in *Plasmodium falciparum* isolates from Dakar, Senegal: impact on rapid malaria diagnostic tests. *Malar J*. 2013;12:34.
16. Kumar N, Pande V, Bhatt RM, Shah NK, Mishra N, Srivastava B, et al. Genetic deletion of HRP2 and HRP3 in Indian *Plasmodium falciparum* population and false negative malaria rapid diagnostic test. *Acta Trop*. 2013 Jan;125(1):119–21
17. Murillo Solano C, Akinyi Okoth S, Abdallah JF, Pava Z, Dorado E, Incardona S, et al. Deletion of *Plasmodium falciparum* Histidine-Rich Protein 2 (*pfhrp2*) and Histidine-Rich Protein 3 (*pfhrp3*) Genes in Colombian Parasites. *PLoS One*. 2015 Jul 7
18. Akinyi Okoth S, Abdallah JF, Ceron N, Adhin MR, Chandrabose J, Krishnalall K, et al. Variation in *Plasmodium falciparum* Histidine-Rich Protein 2 (*Pfhrp2*) and *Plasmodium falciparum* Histidine-Rich Protein 3 (*Pfhrp3*) Gene Deletions in Guyana and Suriname. *PLoS ONE*. 2015;10(5):e0126805.
19. Griffing SM, Gamboa D, Udhayakumar V. The history of 20th century malaria control in Peru. *Malaria Journal*. 2013;12:303.

20. Aramburu GJ, Ramal AC, Witzig R: Malaria reemergence in the Peruvian Amazon region. *Emerg Infect Dis.* 1999, 5: 209-215.
21. Organismo Andino de Salud-PAMAFRO. Compartiendo lecciones aprendidas. Lima: ORAS; 2009.
22. Cox FE. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasites & Vectors.* 2010;3:5.
23. Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 2002 Oct 3;419(6906):498-511.
24. Krungkrai J. The multiple roles of the mitochondrion of the malarial parasite. *Parasitology.* 2004 Nov;129 (Pt 5):511-24.
25. Tangpukdee N, Duangdee C, Wilairatana P, Krudsood S. Malaria Diagnosis: A Brief Review. *Korean J Parasitol.* 2009 Jun;47(2):93-102.
26. 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.
27. Moody A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clin Microbiol Rev.* 2002 Jan;15(1):66-78.
28. Lin JT, Saunders DL, Meshnick SR. The role of submicroscopic parasitemia in malaria transmission: what is the evidence? *Trends in Parasitology.* 2014 Apr 1;30(4):183-90.
29. Maltha J, Gillet P, Jacobs J. Malaria rapid diagnostic tests in endemic settings. *Clin Microbiol Infect.* 2013 May;19(5):399-407.
30. McMorow ML, Aidoo M, Kachur SP. Malaria rapid diagnostic tests in elimination settings--can they find the last parasite? *Clin Microbiol Infect.* 2011 Nov;17(11):1624-31.
31. Baker J, McCarthy J, Gatton M, Kyle DE, Belizario V, Luchavez J, et al. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 (*PfHRP2*) and its effect on the performance of PfHRP2-based rapid diagnostic tests. *J Infect Dis.* 2005 Sep 1;192(5):870-7.

32. Arróspide N, Puray M, Guzmán E, Verano M, Medina S, Mendizábal A, et al. Uso de pruebas inmunocromatográficas para la detección de *Plasmodium falciparum* en donantes de sangre en Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2004;21(2):76–81.
33. Akinyi S, Hayden T, Gamboa D, Torres K, Bendezu J, Abdallah JF, et al. Multiple genetic origins of histidine-rich protein 2 gene deletion in *Plasmodium falciparum* parasites from Peru. *Scientific Reports* [Internet]. 2013 Sep 30
34. Dharia NV, Plouffe D, Bopp SER, González-Páez GE, Lucas C, Salas C, et al. Genome scanning of Amazonian *Plasmodium falciparum* shows subtelomeric instability and clindamycin-resistant parasites. *Genome Res*. 2010 Nov;20(11):1534–44.
35. Abdallah JF, Okoth SA, Fontecha GA, Torres REM, Banegas EI, Matute ML, et al. Prevalence of *pfhrp2* and *pfhrp3* gene deletions in Puerto Lempira, Honduras. *Malar J*. 2015;14:19.
36. Orjuela-Sánchez P, Brandi MC, Ferreira MU. Microsatellite analysis of malaria parasites. *Methods Mol Biol*. 2013;1006:247-58.
37. Carlton JM, Volkman SK, Uplekar S, Hupalo DN, Alves JMP, Cui L, et al. Population genetics, evolutionary genomics, and genome-wide studies of malaria: A view across the International Centers of Excellence for Malaria Research. *Am J Trop Med Hyg*. 2015 Sep 2;93(3 Suppl):87–98.
38. 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 Oct;17(10):1467–82.
39. Bogueau H, Renaud F, Bouchiba H, Durand P, Assi S-B, Henry M-C, et al. Genetic diversity and structure of African *Plasmodium falciparum* populations in urban and rural areas. *Am J Trop Med Hyg*. 2006 Jun 1;74(6):953–9.
40. Leclerc MC, Durand P, de Meeus T, Robert V, Renaud F, 2002. Genetic diversity and population structure of *Plasmodium falciparum* isolates from Dakar, Senegal, investigated from microsatellite and antigen determinant loci. *Microbes Infect* 4: 685–692.

41. Durand P, Michalakis Y, Cestier S, Oury B, Leclerc MC, Tibayrenc M, Renaud F, 2003. Significant linkage disequilibrium and high genetic diversity in a population of *Plasmodium falciparum* from an area (Republic of the Congo) highly endemic for malaria. *Am J Trop Med Hyg* 68: 345–349.
42. Escalante AA, Ferreira MU, Vinetz JM, Volkman SK, Cui L, Gamboa D, et al. Malaria molecular epidemiology: Lessons from the International Centers of Excellence for Malaria Research Network. *Am J Trop Med Hyg.* 2015 Sep 2;93(3 Suppl):79–86.
43. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics.* 2000 Jun 1;155(2):945–59.
44. Larrañaga N, Mejía RE, Hormaza JI, Montoya A, Soto A, Fontecha GA. Genetic structure of *Plasmodium falciparum* populations across the Honduras-Nicaragua border. *Malaria Journal.* 2013;12:354.
45. Echeverry DF, Nair S, Osorio L, Menon S, Murillo C, Anderson TJ. Long term persistence of clonal malaria parasite *Plasmodium falciparum* lineages in the Colombian Pacific region. *BMC Genetics.* 2013;14:2.
46. Jennison C, Arnott A, Tessier N, Tavul L, Koepfli C, Felger I, et al. *Plasmodium vivax* populations are more genetically diverse and less structured than sympatric *Plasmodium falciparum* populations. *PLOS Negl Trop Dis.* 2015 abr;9(4):e0003634.
47. Huelsenbeck JP, Andolfatto P. Inference of population structure under a Dirichlet process model. *Genetics.* 2007 Apr 1;175(4):1787–802.
48. Porras-Hurtado L, Ruiz Y, Santos C, Phillips C, Carracedo A, Lareu MV. An overview of STRUCTURE: applications, parameter settings, and supporting software. *Front Genet.* 2013;4:98.
49. Daniels R, Chang H-H, Séne PD, Park DC, Neafsey DE, Schaffner SF, et al. Genetic surveillance detects both clonal and epidemic transmission of malaria following enhanced intervention in Senegal. *PLOS ONE.* 2013 abr;8(4):e60780.
50. Griffing SM, Mixson-Hayden T, Sridaran S, Alam MT, McCollum AM, Cabezas C, et al. South American *Plasmodium falciparum* after the malaria eradication era: clonal population expansion and survival of the fittest hybrids. *PLoS ONE.* 2011;6(9):e23486.
51. Branch OH, Sutton PL, Barnes C, Castro JC, Hussin J, Awadalla P, et al. *Plasmodium falciparum* genetic diversity maintained and amplified over 5

years of a low transmission endemic in the Peruvian Amazon. *Mol Biol Evol.* 2011 Jul;28(7):1973–86.

52. Ferdig MT, Su XZ. Microsatellite markers and genetic mapping in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today (Regul Ed)*. 2000 Jul;16(7):307–12.
53. Su X z, Wellems TE. Toward a high-resolution *Plasmodium falciparum* linkage map: polymorphic markers from hundreds of simple sequence repeats. *Genomics*. 1996 May 1;33(3):430–44.
54. Su X, Ferdig MT, Huang Y, Huynh CQ, Liu A, You J, et al. A genetic map and recombination parameters of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*. 1999 Nov 12;286(5443):1351–3.
55. Howard J, Carlton JM, Walliker D, Jensen JB. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique in inheritance studies of *Plasmodium falciparum*. *J Parasitol*. 1996 Dec;82(6):941–6.
56. Farooq U, Dubey ML, Shrivastava SK, Mahajan RC. Genetic polymorphism in *Plasmodium falciparum*: differentiation of parasite isolates of high & low virulence by RAPD. *Indian J Med Res*. 2012 Aug;136(2):292–5.
57. Ohrt C, Mirabelli-Primdahl L, Karnasuta C, Chantakulkij S, Kain KC. Distinguishing *Plasmodium falciparum* treatment failures from reinfections by restrictions fragment length polymorphism and polymerase chain reaction genotyping. *Am J Trop Med Hyg*. 1997 Oct;57(4):430–7.
58. Kain KC, Craig AA, Ohrt C. Single-strand conformational polymorphism analysis differentiates *Plasmodium falciparum* treatment failures from re-infections. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1996 Aug 1;79(2):167–75.
59. Rubio JM, Berzosa PJ, Benito A. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) protocol for genotyping the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Parasitology*. 2001 Oct;123(Pt 4):331–6.
60. Liljander A, Wiklund L, Falk N, Kweku M, Mårtensson A, Felger I, et al. Optimization and validation of multi-coloured capillary electrophoresis for genotyping of *Plasmodium falciparum* merozoite surface proteins (msp1 and 2). *Malar J*. 2009 Apr 23;8:78.

61. Färnert A, Arez AP, Babiker HA, Beck HP, Benito A, Björkman A, et al. Genotyping of *Plasmodium falciparum* infections by PCR: a comparative multicentre study. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001 Mar 1;95(2):225–32.
62. Kiwanuka GN. Genetic diversity in *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 and 2 coding genes and its implications in malaria epidemiology: a review of published studies from 1997-2007. *J Vector Borne Dis.* 2009 Mar;46(1):1–12
63. Li Y-C, Korol AB, Fahima T, Nevo E. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Mol Biol Evol.* 2004 Jun;21(6):991–1007.
64. Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet.* 2004 Jun;5(6):435–45
65. Anderson TJ, Su XZ, Roddam A, Day KP. Complex mutations in a high proportion of microsatellite loci from the protozoan parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Ecol.* 2000 Oct;9(10):1599–608.
66. Anderson TJ, Su XZ, Bockarie M, Lagog M, Day KP. Twelve microsatellite markers for characterization of *Plasmodium falciparum* from finger-prick blood samples. *Parasitology.* 1999 Aug;119 (Pt 2):113–25.
67. Machado RLD, Pova MM, Calvosa VSP, Ferreira MU, Rossit ARB, dos Santos EJM, et al. Genetic structure of *Plasmodium falciparum* populations in the Brazilian Amazon region. *J Infect Dis.* 2004 Nov 1;190(9):1547–55.
68. Greenhouse B, Myrick A, Dikomajilar C, Woo JM, Carlson EJ, Rosenthal PJ, et al. Validation of microsatellite markers for use in genotyping polyclonal *Plasmodium falciparum* infections. *Am J Trop Med Hyg.* 2006 Nov;75(5):836–42.
69. Nyachieo A, VAN Overmeir C, Laurent T, Dujardin J-C, D'Alessandro U. *Plasmodium falciparum* genotyping by microsatellites as a method to distinguish between recrudescence and new infections. *Am J Trop Med Hyg.* 2005 Jul;73(1):210–3.
70. Chenet SM, Schneider KA, Villegas L, Escalante AA. Local population structure of *Plasmodium*: impact on malaria control and elimination. *Malaria Journal.* 2012 Dec 11;11(1):412.

71. Moreno M, Saavedra MP, Bickersmith SA, Lainhart W, Tong C, Alava F, et al. Implications for changes in *Anopheles darlingi* biting behaviour in three communities in the peri-Iquitos region of Amazonian Peru. *Malar J*. 2015 Jul 30;14:290.
72. Maheu-Giroux M, Casapía M, Soto-Calle VE, Ford LB, Buckeridge DL, Coomes OT, Gyorkos TW. Risk of malaria transmission from fish ponds in the Peruvian Amazon. *Acta Tropica*. 2010 115(1-2):112-118.
73. Google Maps. Mapa de las comunidades de Cahuide, San José de Lupuna y Santa Emilia- Iquitos-Perú. [Internet] Link URL: <https://www.google.com.pe/maps/@-4.0315297,-73.9961674,9z>
74. Sambrook J, Maccallum P, Russel D. Molecular cloning: A laboratory manual, 3rd ed. Cold Springs Harbour Press, NY, 2001, ISBN 0-87959-577-3, p.2344.
75. Mangold KA, 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 May;43(5):2435-40.
76. Lasken RS, Egholm M. Whole genome amplification: abundant supplies of DNA from precious samples or clinical specimens. *Trends Biotechnol*. 2003 Dec;21(12):531-5.
77. Van den Eede, P., A. Erhart, G. Van der Auwera, C. Van Overmeir, N.D. Thang, X. Hung le, J. Anne, and U. D'Alessandro, 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): p. 223-7.
78. Peakall R, Smouse PE. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. *Bioinformatics*. 2012 Oct 1;28(19):2537-9.
79. Goudet J. FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-Statistics. *J Hered*. 1995 Nov 1;86(6):485-6.
80. Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1973 Dec;70(12):3321-3.

81. Rousset F. genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*. 2008 Jan 1;8(1):103–6.
82. Wright S. The genetical structure of populations. *Ann. Eugenics* 1951; 15,323–354.
83. Weir BS, Cockerham CC. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution*. 1984;38(6):1358–70.
84. Meirmans PG, Hedrick PW. Assessing population structure: FST and related measures. *Molecular Ecology Resources*. 2011 Jan 1;11(1):5–18.
85. Hedrick PW. A standardized genetic differentiation measure. *Evolution*. 2005 Aug 1;59(8):1633–8.
86. Hartl, D. L. and A. G. Clark. *Principles of Population Genetics*. 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts; 1989.p. 682.
87. Meirmans PG: 2006. Using the AMOVA framework to estimate a standardized genetic differentiation measure. *Evolution*. 60:2399-2402.
88. Orjuela-Sanchez, P., N.S. da Silva, M. da Silva-Nunes, and M.U. Ferreira, Recurrent parasitemias and population dynamics of *Plasmodium vivax* polymorphisms in rural Amazonia. *Am J Trop Med Hyg*, 2009. 81(6): p. 961-8.
89. Van den Eede, P., G. Van der Auwera, C. Delgado, T. Huyse, V.E. Soto-Calle, D. Gamboa, T. Grande, H. Rodriguez, A. Llanos, J. Anne, A. Erhart, and U. D'Alessandro, Multilocus genotyping reveals high heterogeneity and strong local population structure of the *Plasmodium vivax* population in the Peruvian Amazon. *Malar J*, 2010. 9: p. 151.
90. Haubold B, Hudson RR. LIAN 3.0: detecting linkage disequilibrium in multilocus data. *Linkage Analysis. Bioinformatics*. 2000 Sep;16(9):847–8.
91. Eliades N-G., Eliades D. G. (2009). HAPLOTYPE ANALYSIS: Software for analysis of haplotype data. Distributed by the authors. Forest Genetics and Forest Tree Breeding, Georg-August University Goettingen, Germany. Link URL: <http://www.uni-goettingen.de/en/134935.htm>

92. Pritchard JK, Wena X, Falush D. Documentation for structure software: Version 2.3. 2010. Department of Human Genetics, University of Chicago
93. Porras-Hurtado L, Ruiz Y, Santos C, Phillips C, Carracedo A, Lareu MV. An overview of STRUCTURE: applications, parameter settings, and supporting software. *Front Genet.* 2013;4:98.
94. Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol.* 2005 Jul;14(8):2611–20.
95. Earl DA, vonHoldt BM. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genet Resour.* 2011 Oct 13;4(2):359–61.
96. 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 Jul 15;23(14):1801–6.
97. distruct: a program for the graphical display of population structure - Rosenberg - 2003 - *Molecular Ecology Notes* - Wiley Online Library [cited 2016 Jul 7].
98. StataCorp. 2015. Stata Statistical Software: Release 14. College Station, TX: StataCorp LP.
99. Sáenz FE, Morton LC, Okoth SA, Valenzuela G, Vera-Arias CA, Vélez-Álvarez E, et al. Clonal population expansion in an outbreak of *Plasmodium falciparum* on the northwest coast of Ecuador. *Malar J.* 2014;13 Suppl 1:497.
100. Scherf A, Mattei D. Cloning and characterization of chromosome breakpoints of *Plasmodium falciparum*: breakage and new telomere formation occurs frequently and randomly in subtelomeric genes. *Nucleic Acids Res.* 1992 Apr 11;20(7):1491–6.
101. Cheng Q, Gatton ML, Barnwell J, Chiodini P, McCarthy J, Bell D, et al. *Plasmodium falciparum* parasites lacking histidine-rich protein 2 and 3: a review and recommendations for accurate reporting. *Malar J.* 2014;13:283.
102. Hernández-Rivas R, Herrera-Solorio AM, Sierra-Miranda M, Delgadillo DM, Vargas M. Impact of chromosome ends on the biology and virulence of

- Plasmodium falciparum*. Molecular and Biochemical Parasitology. 2013 Feb;187(2):121–8.
103. Mzilahowa T, McCall PJ, Hastings IM. “Sexual” population structure and genetics of the malaria agent *P. falciparum*. PLoS ONE 2007 Jul 18 2(7)
 104. Ribacke U, Mok BW, Wirta V, Normark J, Lundeberg J, Kironde F, et al. Genome wide gene amplifications and deletions in *Plasmodium falciparum*. Molecular and Biochemical Parasitology. 2007 Sep;155(1):33–44.
 105. Arnott A, Barry AE, Reeder JC. Understanding the population genetics of *Plasmodium vivax* is essential for malaria control and elimination. Malaria J. 2012 Jan 10;11:14.
 106. Rebaudet S, Bogreau H, Silai R, Lepere JF, Bertaux L, Pradines B, et al. Genetic structure of *Plasmodium falciparum* and elimination of malaria, Comoros archipelago. Emerging Infect Dis. 2010 Nov;16(11):1686–94.
 107. Pumpaibool T, Arnathau C, Durand P, Kanchanakhan N, Siripoon N, Suegorn A, et al. Genetic diversity and population structure of *Plasmodium falciparum* in Thailand, a low transmission country. Malar J. 2009;8:155.
 108. Iwagami M, Rivera PT, Villacorte EA, Escueta AD, Hatabu T, Kawazu S, et al. Genetic diversity and population structure of *Plasmodium falciparum* in the Philippines. Malar J. 2009 May 8;8:96.
 109. Carter TE, Malloy H, Existe A, Memnon G, St Victor Y, Okech BA, et al. Genetic Diversity of *Plasmodium falciparum* in Haiti: Insights from microsatellite markers. PLoS ONE. 2015;10(10):e0140416.
 110. Orjuela-Sánchez P, Da Silva-Nunes M, Da Silva NS, Scopel KKG, Gonçalves RM, Malafronte RS, et al. Population dynamics of genetically diverse *Plasmodium falciparum* lineages: community-based prospective study in rural Amazonia. Parasitology. 2009 Sep;136(10):1097
 111. Sáenz FE, Morton LC, Okoth SA, Valenzuela G, Vera-Arias CA, Vélez-Álvarez E, et al. Clonal population expansion in an outbreak of *Plasmodium falciparum* on the northwest coast of Ecuador. Malar J. 2014;13 Suppl 1:497

112. Obaldia N, Baro NK, Calzada JE, Santamaria AM, Daniels R, Wong W, et al. Clonal outbreak of *Plasmodium falciparum* infection in eastern Panama. *J Infect Dis.* 2015 Apr 1;211(7):1087–96.
113. Okoth SA, Chenet SM, Arrospide N, Gutierrez S, Cabezas C, Matta JA, et al. Molecular Investigation into a Malaria Outbreak in Cusco, Peru: *Plasmodium falciparum* BV1 lineage is linked to a second outbreak in recent times. *Am J Trop Med Hyg.* 2016 Jan;94(1):128–31.
114. Smith JM, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG. How clonal are bacteria? *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993 May 15;90(10):4384–8.
115. Ramírez JD, Llewellyn MS. Reproductive clonality in protozoan pathogens—truth or artefact? *Mol Ecol.* 2014 Sep;23(17):4195–202.
116. Tibayrenc M, Ayala FJ. New insights into clonality and panmixia in *Plasmodium* and *Toxoplasma*. *Adv Parasitol.* 2014;84:253–68.
117. Manske M, Miotto O, Campino S, Auburn S, Almagro-Garcia J, Maslen G, et al. Analysis of *Plasmodium falciparum* diversity in natural infections by deep sequencing. *Nature.* 2012 Jul 19;487(7407):375–9.
118. Fricke JM, Vardo-Zalik AM, Schall JJ. Geographic genetic differentiation of a malaria parasite, *Plasmodium mexicanum*, and its lizard host, *Sceloporus occidentalis*. *J Parasitol.* 2010 Apr;96(2):308–13.
119. Creasey, A. M., B. Fenton, A. Walker, S. Thaithong, S. Oliveira, S. Mutambu, and D. Walliker. 1990. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* shows geographic variation. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 42:403–413.
120. Walliker, D., H. Babiker, and L. Ranford-Cartwright. 1998. The genetic structure of malaria parasite populations. In *Malaria: Parasite biology, pathogenesis, and protection*. Sherman, I. W. (ed.). American Society for Microbiology. Washington, D.C. 235–251.
121. Conway DJ. Molecular epidemiology of malaria. *Clin Microbiol Rev.* 2007 Jan;20(1):188–204.

122. Conway DJ, Fanello C, Lloyd JM, Al-Joubori BM, Baloch AH, Somanath SD, et al. Origin of *Plasmodium falciparum* malaria is traced by mitochondrial DNA. *Mol Biochem Parasitol*. 2000 Nov;111(1):163–71.
123. Zhong D, Afrane Y, Githeko A, Yang Z, Cui L, Menge DM, et al. *Plasmodium falciparum* genetic diversity in western Kenya highlands. *Am J Trop Med Hyg*. 2007 Dec;77(6):1043–50.
124. Anthony TG, Conway DJ, Cox-Singh J, Matusop A, Ratnam S, Shamsul S, et al. Fragmented population structure of *Plasmodium falciparum* in a region of declining endemicity. *J Infect Dis*. 2005 May 1;191(9):1558–64.
125. Chuquiyauri R, Paredes M, Peñataro P, Torres S, Marin S, Tenorio A, et al. Socio-demographics and the development of malaria elimination strategies in the low transmission setting. *Acta Trop*. 2012 Mar;121(3):292–302.
126. Baldeviano GC, Okoth SA, Arrospide N, Gonzalez RV, Sánchez JF, Macedo S, et al. Molecular epidemiology of *Plasmodium falciparum* malaria outbreak, Tumbes, Peru, 2010–2012. *Emerging Infectious Diseases* [Internet]. 2015 May [cited 2016 Jul 7];21(5).
127. McCollum AM, Mueller K, Villegas L, Udhayakumar V, Escalante AA. Common origin and fixation of *Plasmodium falciparum dhfr* and *dhps* mutations associated with sulfadoxine-pyrimethamine resistance in a low-transmission area in South America. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Jun;51(6):2085–91.
128. Scopel KKG, Fontes CJF, Nunes AC, Horta MF, Braga EM. Low sensitivity of nested PCR using *Plasmodium* DNA extracted from stained thick blood smears: an epidemiological retrospective study among subjects with low parasitaemia in an endemic area of the Brazilian Amazon region. *Malar J*. 2004 Mar 31;3:8.
129. Imwong M, Hanchana S, Malleret B, Rénia L, Day NPJ, Dondorp A, et al. High-Throughput ultrasensitive molecular techniques for quantifying low-density malaria parasitemias. *J Clin Microbiol*. 2014 Sep 1;52(9):3303–9.

130. Torres KJ, Castrillon CE, Moss EL, Saito M, Tenorio R, Molina DM, et al. Genome-Level determination of *Plasmodium falciparum* blood stage targets of malarial clinical immunity in the Peruvian Amazon. J Infect Dis. 2014 Nov 7
131. 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. Malaria Journal. 2014;13

ANEXO 1

Lista de muestras analizadas en la prevalencia de deleciones de *pfhrp2*, *pfhrp3* y genes flanqueantes de *P.falciparum*

| Comunidad | Código | Código | Fecha de muestreo | Microscopía | Cq PCR | Cq categoría | Resultado de PCR | | | | | |
|-----------|----------|---------|-------------------|--------------|--------|--------------|------------------|---------------|----------|----------|----------|----------|
| | Muestreo | Persona | | | | | <i>Pfhrp2</i> | <i>Pfhrp3</i> | 831700 | 8311900 | 1372100 | 1372400 |
| CAH | AC002654 | M1A145A | 11/12/12 | P.falciparum | 28.22 | Temprano | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| CAH | AC002748 | M1F031G | 12/12/12 | Negativo | 28.33 | Temprano | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC002796 | M1B048E | 13/12/12 | Negativo | 28.02 | Temprano | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| CAH | AC003083 | M1F007B | 20/12/12 | Negativo | 26.46 | Temprano | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC005334 | M1B039A | 7/3/13 | Negativo | 27.40 | Temprano | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC005337 | M1B039E | 7/3/13 | Negativo | 24.37 | Temprano | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC005339 | M1B039H | 7/3/13 | Negativo | 27.53 | Temprano | Positivo | Positivo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC005346 | M1B048F | 7/3/13 | Negativo | 28.51 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC005411 | M1B039A | 8/3/13 | Negativo | 26.49 | Temprano | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC005412 | M1B039E | 8/3/13 | Negativo | 26.39 | Temprano | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC005413 | M1B039H | 8/3/13 | P.falciparum | 26.95 | Temprano | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC005473 | M1A006A | 8/3/13 | Negativo | 32.59 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo | Negativo | Positivo |
| CAH | AC005697 | M1B039A | 11/3/13 | P.falciparum | 25.68 | Temprano | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC005700 | M1B039E | 11/3/13 | P.falciparum | 20.16 | Temprano | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC005725 | M1A082C | 11/3/13 | P.falciparum | 25.02 | Temprano | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC005751 | M1B057A | 12/3/13 | P.falciparum | 23.09 | Temprano | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC006011 | M1A157G | 19/3/13 | Negativo | 32.14 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| CAH | AC008467 | M1A095B | 3/6/13 | Negativo | 31.24 | Intermedio | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo |
| CAH | AC011568 | M1A018B | 2/9/13 | Negativo | 33.06 | Intermedio | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| CAH | AC011970 | M1F038G | 6/9/13 | Negativo | 33.12 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC012050 | M1A128E | 7/9/13 | Negativo | 33.13 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC012094 | M1A133B | 7/9/13 | Negativo | 31.95 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC012095 | M1A153A | 7/9/13 | Negativo | 30.07 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC012096 | M1A153B | 7/9/13 | Negativo | 31.24 | Intermedio | Positivo | Positivo | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo |
| CAH | AC012330 | M1A074G | 11/9/13 | Negativo | 31.4 | Intermedio | Negativo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC012331 | M1A079B | 11/9/13 | Negativo | 30.39 | Intermedio | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC012332 | M1A078C | 11/9/13 | Negativo | 28.73 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC012333 | M1A074F | 11/9/13 | Negativo | 29.06 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC012334 | M1A077A | 11/9/13 | Negativo | 32.32 | Intermedio | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC012358 | M1A074J | 12/9/13 | Negativo | 29.78 | Intermedio | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo |

| | | | | | | | | | | | | |
|-----|----------|---------|----------|----------|-------|------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| CAH | AC012360 | M1A074C | 12/9/13 | Negativo | 30.71 | Intermedio | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Negativo |
| CAH | AC012361 | M1A082H | 12/9/13 | Negativo | 32.77 | Intermedio | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| CAH | AC012362 | M1A083A | 12/9/13 | Negativo | 32.33 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo | Negativo | Positivo |
| CAH | AC012365 | M1A075C | 12/9/13 | Negativo | 30.25 | Intermedio | Positivo | Negativo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC012379 | M1A090D | 13/9/13 | Negativo | 31.25 | Intermedio | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo | Negativo | Negativo |
| CAH | AC012380 | M1A096A | 13/9/13 | Negativo | 30.75 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC012381 | M1A095C | 13/9/13 | Negativo | 30.41 | Intermedio | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC012386 | M1A086C | 13/9/13 | Negativo | 31.38 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Positivo | Negativo |
| CAH | AC012409 | M1A055G | 16/9/13 | Negativo | 32.72 | Intermedio | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo |
| CAH | AC012420 | M1A074A | 17/9/13 | Negativo | 30.6 | Intermedio | Positivo | Negativo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC012421 | M1A075A | 17/9/13 | Negativo | 30.7 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC012422 | M1A075D | 17/9/13 | Negativo | 31.85 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC012434 | M1A048C | 18/9/13 | Negativo | 31.05 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC012438 | M1A080B | 18/9/13 | Negativo | 30.96 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC012476 | M1A092B | 24/9/13 | Negativo | 32.93 | Intermedio | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo |
| CAH | AC012477 | M1A103C | 24/9/13 | Negativo | 29.9 | Intermedio | Negativo | Positivo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC012497 | M1B032A | 24/9/13 | Negativo | 31.56 | Intermedio | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC014875 | M1F021E | 6/12/13 | Negativo | 32.32 | Intermedio | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC014885 | M1F044A | 6/12/13 | Negativo | 33.34 | Intermedio | Positivo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| CAH | AC014908 | M1F030A | 7/12/13 | Negativo | 30.38 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC014913 | M1F032E | 7/12/13 | Negativo | 32.43 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| CAH | AC014914 | M1F032F | 7/12/13 | Negativo | 33.42 | Intermedio | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC014916 | M1F033B | 7/12/13 | Negativo | 29.48 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC014923 | M1F038G | 7/12/13 | Negativo | 30.89 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC015087 | M1F007F | 10/12/13 | Negativo | 32.93 | Intermedio | Negativo | Positivo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| CAH | AC015091 | M1F028D | 10/12/13 | Negativo | 31.91 | Intermedio | Negativo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC015092 | M1F030D | 10/12/13 | Negativo | 31.67 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC015093 | M1F031E | 10/12/13 | Negativo | 31.48 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC015095 | M1F032C | 10/12/13 | Negativo | 32.28 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC015097 | M1F034C | 10/12/13 | Negativo | 32.04 | Intermedio | Positivo | Negativo | Positivo | Negativo | Positivo | Negativo |
| CAH | AC015098 | M1F034D | 10/12/13 | Negativo | 33.18 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo | Negativo |
| CAH | AC015099 | M1F035C | 10/12/13 | Negativo | 32.37 | Intermedio | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC015104 | M1F025D | 11/12/13 | Negativo | 31.75 | Intermedio | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC015189 | M1F025A | 13/12/13 | Negativo | 33.1 | Intermedio | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC015312 | M1F021G | 18/12/13 | Negativo | 32.99 | Intermedio | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo | Negativo | Positivo |
| CAH | AC015337 | M1A161F | 19/12/13 | Negativo | 30.1 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC015346 | M1A157C | 19/12/13 | Negativo | 32.87 | Intermedio | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC015347 | M1A157E | 19/12/13 | Negativo | 31.93 | Intermedio | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo |
| CAH | AC015348 | M1A157G | 19/12/13 | Negativo | 33.14 | Intermedio | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo | Negativo | Positivo |
| CAH | AC015351 | M1A160E | 19/12/13 | Negativo | 32.38 | Intermedio | Positivo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Negativo |

| | | | | | | | | | | | | |
|-----|----------|---------|----------|--------------|-------|------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| CAH | AC015363 | M1A150D | 20/12/13 | Negativo | 32.03 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC015387 | M1F027B | 20/12/13 | Negativo | 33.08 | Intermedio | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC015388 | M1F027C | 20/12/13 | Negativo | 32.76 | Intermedio | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| CAH | AC015401 | M1A045B | 26/12/13 | Negativo | 31.68 | Intermedio | Negativo | Positivo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo |
| CAH | AC015402 | M1A045C | 26/12/13 | Negativo | 32.62 | Intermedio | Negativo | Positivo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| CAH | AC020135 | M1A053C | 3/6/14 | Negativo | 33.22 | Intermedio | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo |
| LUP | AL000661 | M1D025C | 10/9/12 | P.falciparum | 22.85 | Temprano | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| LUP | AL000690 | M1D027H | 11/9/12 | Negativo | 29.67 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| LUP | AL000691 | M1D027I | 11/9/12 | Negativo | 27.22 | Temprano | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| LUP | AL000725 | M1D025C | 14/9/12 | P.falciparum | 31.86 | Intermedio | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo | Negativo | Positivo |
| LUP | AL000732 | M1D027I | 15/9/12 | Negativo | 27.46 | Temprano | Positivo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo |
| LUP | AL000919 | M1D020A | 2/10/12 | P.falciparum | 29.31 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| LUP | AL002119 | M1D027H | 6/12/12 | P.falciparum | 29.06 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| LUP | AL004452 | M1E003B | 4/3/13 | P.falciparum | 26.65 | Temprano | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| LUP | AL007686 | M1D020B | 7/6/13 | Negativo | 29.56 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| LUP | AL007702 | M1D041B | 7/6/13 | Negativo | 32.12 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Negativo |
| LUP | AL007860 | M1D052C | 10/6/13 | P.falciparum | 25.71 | Temprano | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| LUP | AL007862 | M1D059A | 10/6/13 | P.vivax | 27.48 | Temprano | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| LUP | AL008139 | M1D025A | 17/6/13 | P.falciparum | 25.85 | Temprano | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| LUP | AL008140 | M1D025H | 17/6/13 | P.falciparum | 21.69 | Temprano | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| LUP | AL008170 | M1D055C | 18/6/13 | P.falciparum | 24.13 | Temprano | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| LUP | AL008226 | M1C020B | 20/6/13 | Negativo | 33.47 | Intermedio | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo |
| LUP | AL008238 | M1C031E | 21/6/13 | Negativo | 33.1 | Intermedio | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Positivo |
| LUP | AL008241 | M1C083D | 21/6/13 | Negativo | 33.2 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| LUP | AL008282 | M1C066C | 27/6/13 | Negativo | 32.8 | Intermedio | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo |
| LUP | AL010105 | M1D050D | 2/9/13 | Negativo | 32.57 | Intermedio | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo |
| LUP | AL010107 | M1C010C | 2/9/13 | Negativo | 30.39 | Intermedio | Positivo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo |
| LUP | AL010111 | M1C012B | 2/9/13 | Negativo | 32.25 | Intermedio | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo |
| LUP | AL010352 | M1E046A | 4/9/13 | P.falciparum | 23.13 | Temprano | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| LUP | AL010498 | M1D020D | 6/9/13 | Negativo | 33.41 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo | Negativo |
| LUP | AL010540 | M1D053D | 6/9/13 | Negativo | 33.3 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Positivo | Negativo |
| LUP | AL010579 | M1E040A | 9/9/13 | Negativo | 33.03 | Intermedio | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Positivo |
| LUP | AL010602 | M1E056B | 9/9/13 | Negativo | 31.54 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo |
| LUP | AL010616 | M1E078E | 9/9/13 | Negativo | 32.73 | Intermedio | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo |
| LUP | AL010689 | M1E045A | 10/9/13 | Negativo | 33.21 | Intermedio | Positivo | Negativo | Positivo | Negativo | Positivo | Negativo |
| LUP | AL010697 | M1D001B | 10/9/13 | Negativo | 30.52 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Negativo |
| LUP | AL010698 | M1D001C | 10/9/13 | Negativo | 31.5 | Intermedio | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo | Negativo | Positivo |
| LUP | AL010699 | M1D002B | 10/9/13 | Negativo | 31.75 | Intermedio | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo |
| LUP | AL010707 | M1D029B | 10/9/13 | Negativo | 32.65 | Intermedio | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo |
| LUP | AL010738 | M1C062B | 10/9/13 | Negativo | 31.01 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |

| | | | | | | | | | | | | |
|-----|----------|---------|---------|--------------|-------|------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| LUP | AL010771 | M1D057A | 11/9/13 | Negativo | 31.87 | Intermedio | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo |
| LUP | AL010773 | M1C108A | 11/9/13 | Negativo | 31.57 | Intermedio | Negativo | Positivo | Positivo | Negativo | Positivo | Negativo |
| LUP | AL010796 | M1E026B | 12/9/13 | Negativo | 31.33 | Intermedio | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo |
| LUP | AL010798 | M1E043B | 12/9/13 | Negativo | 30.92 | Intermedio | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| LUP | AL010826 | M1C001C | 12/9/13 | Negativo | 31.84 | Intermedio | Negativo | Positivo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| LUP | AL010835 | M1E006F | 13/9/13 | Negativo | 32.7 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| LUP | AL010856 | M1E046A | 16/9/13 | P.falciparum | 33.26 | Intermedio | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| LUP | AL010857 | M1E046C | 16/9/13 | Negativo | 32.34 | Intermedio | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| LUP | AL010875 | M1D045C | 16/9/13 | Negativo | 32.92 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo |
| LUP | AL010902 | M1C058A | 16/9/13 | P.falciparum | 28.1 | Temprano | Positivo | Positivo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo |
| LUP | AL010916 | M1D003B | 17/9/13 | Negativo | 31.75 | Intermedio | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| LUP | AL010945 | M1D006A | 19/9/13 | Negativo | 32.04 | Intermedio | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo |
| LUP | AL010988 | M1D023B | 27/9/13 | Negativo | 25.69 | Temprano | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| LUP | AL013360 | M1C002A | 9/12/13 | P.falciparum | 29.56 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| LUP | AL015482 | M1C024D | 3/3/14 | P.falciparum | 22.08 | Temprano | Positivo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| LUP | AL016314 | M1E009A | 27/3/14 | P.falciparum | 24.39 | Temprano | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| LUP | AL018388 | M1C061B | 4/6/14 | Negativo | 28.67 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| LUP | AL018545 | M1D026F | 6/6/14 | Negativo | 32.17 | Intermedio | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo |
| LUP | AL018631 | M1C047B | 7/6/14 | Negativo | 28.12 | Temprano | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| LUP | AL018679 | M1D026F | 9/6/14 | Negativo | 29.28 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| LUP | AL018688 | M1D051A | 9/6/14 | P.falciparum | 25.38 | Temprano | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| LUP | AL018741 | M1E052C | 10/6/14 | P.falciparum | 22.13 | Temprano | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| LUP | AL018927 | M1D026F | 18/6/14 | P.falciparum | 32.07 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| LUP | AL018955 | M1D053A | 19/6/14 | P.falciparum | 30.36 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| SEM | AVA00005 | M6G005B | 1/3/13 | P.falciparum | 30.71 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00010 | M6G006E | 1/3/13 | Negativo | 30.1 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00011 | M6G007A | 1/3/13 | P.falciparum | 24.64 | Temprano | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| SEM | AVA00012 | M6G008A | 1/3/13 | P.falciparum | 29.97 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00013 | M6G008B | 1/3/13 | Negativo | 29.38 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| SEM | AVA00017 | M6G008F | 1/3/13 | Negativo | 31.87 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00022 | M6G009E | 1/3/13 | P.falciparum | 28.9 | Temprano | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00025 | M6G010A | 1/3/13 | Negativo | 29.49 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00027 | M6G010D | 1/3/13 | P.falciparum | 27.1 | Temprano | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00037 | M6G013C | 1/3/13 | P.falciparum | 27.21 | Temprano | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| SEM | AVA00038 | M6G013D | 1/3/13 | P.falciparum | 28.2 | Temprano | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| SEM | AVA00040 | M6G001A | 1/3/13 | Negativo | 31.4 | Intermedio | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00054 | M6G019A | 1/3/13 | Negativo | 27.05 | Temprano | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| SEM | AVA00056 | M6G019C | 1/3/13 | Negativo | 31.7 | Intermedio | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo | Negativo | Positivo |
| SEM | AVA00062 | M6G020D | 1/3/13 | P.falciparum | 32.17 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| SEM | AVA00084 | M6G030C | 1/3/13 | P.falciparum | 24.53 | Temprano | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |

| | | | | | | | | | | | | |
|-----|----------|---------|---------|--------------|-------|------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| SEM | AVA00086 | M6G019F | 1/3/13 | P.falciparum | 22.86 | Temprano | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00091 | M6G027E | 2/3/13 | P.vivax | 32.08 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00098 | M6G025G | 2/3/13 | P.falciparum | 22.7 | Temprano | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00134 | M6G014A | 2/3/13 | P.falciparum | 31.1 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| SEM | AVA00141 | M6G009B | 2/3/13 | Negativo | 31.74 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| SEM | AVA00145 | M6G029A | 2/3/13 | Negativo | 29.13 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| SEM | AVA00146 | M6G005A | 2/3/13 | P.falciparum | 26.64 | Temprano | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00152 | M6G001A | 10/3/13 | P.falciparum | 32.23 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00159 | M6G002C | 12/3/13 | P.falciparum | 27 | Temprano | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| SEM | AVA00161 | M6G019A | 10/3/13 | P.falciparum | 31.41 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| SEM | AVA00162 | M6G004A | 10/3/13 | Negativo | 30.55 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00172 | M6G005A | 10/3/13 | P.falciparum | 32.76 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00173 | M6G005B | 10/3/13 | P.falciparum | 31.83 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00177 | M6G008D | 10/3/13 | P.falciparum | 27.33 | Temprano | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00210 | M6G011D | 10/3/13 | P.falciparum | 29.77 | Intermedio | Negativo | Positivo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00220 | M6G013F | 10/3/13 | Negativo | 30.33 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| SEM | AVA00232 | M6G026G | 10/3/13 | Negativo | 33.4 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Negativo |
| SEM | AVA00260 | M6G027C | 10/3/13 | Negativo | 30.07 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00264 | M6G023B | 10/3/13 | Negativo | 29.44 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00280 | M6G014A | 10/3/13 | P.falciparum | 31.45 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| SEM | AVA00286 | M6G022B | 10/3/13 | P.vivax | 33.12 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Negativo |
| SEM | AVA00303 | M6G002G | 10/3/13 | Negativo | 30.55 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| SEM | AVA00319 | M6G034B | 21/3/13 | Negativo | 32.69 | Intermedio | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00323 | M6G004A | 21/3/13 | Negativo | 31.71 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00327 | M6G004E | 21/3/13 | P.falciparum | 27.26 | Temprano | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00381 | M6G024D | 21/3/13 | P.falciparum | 29.09 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| SEM | AVA00400 | M6G027C | 21/3/13 | P.falciparum | 30.37 | Intermedio | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00401 | M6G027A | 21/3/13 | Negativo | 33.33 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00449 | M6G006E | 21/3/13 | Negativo | 31.77 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00455 | M6G005D | 21/3/13 | P.falciparum | 27.03 | Temprano | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00466 | M6G027E | 21/3/13 | P.falciparum | 27.66 | Temprano | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00479 | M6G009A | 31/3/13 | Negativo | 32.47 | Intermedio | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo |
| SEM | AVA00484 | M6G033B | 31/3/13 | Negativo | 30.5 | Intermedio | Positivo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| SEM | AVA00511 | M6G022C | 31/3/13 | Negativo | 31.12 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| SEM | AVA00523 | M6G026F | 31/3/13 | P.falciparum | 30.63 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00525 | M6G026A | 31/3/13 | Negativo | 28.5 | Temprano | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00573 | M6G029A | 31/3/13 | Negativo | 30.71 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo | Negativo | Positivo |
| SEM | AVA00575 | M6G004E | 31/3/13 | P.falciparum | 31.77 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00580 | M6G028E | 31/3/13 | Negativo | 30.83 | Intermedio | Negativo | Positivo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00582 | M6G002B | 31/3/13 | ND | 32.05 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Negativo | Positivo |

| | | | | | | | | | | | | |
|-----|----------|---------|----------|--------------|-------|------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| SEM | AVA00584 | M6G002G | 31/3/13 | Negativo | 31.51 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| SEM | AVA00595 | M6G006A | 31/3/13 | P.falciparum | 26.56 | Temprano | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00598 | M6G011A | 31/3/13 | P.falciparum | 31.08 | Intermedio | Negativo | Positivo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00604 | M6G026D | 31/3/13 | Negativo | 28.79 | Temprano | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00605 | M6G034D | 31/3/13 | Negativo | 30.45 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00608 | M6G019C | 31/3/13 | Negativo | 32.29 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| SEM | AVA00641 | M6G005D | 5/5/13 | P.falciparum | 31.86 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00642 | M6G005F | 5/5/13 | P.falciparum | 32.03 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00673 | M6G015A | 5/5/13 | Negativo | 31.81 | Intermedio | Negativo | Positivo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00686 | M6G026A | 5/5/13 | Negativo | 31.32 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00702 | M6G024B | 5/5/13 | Negativo | 33.39 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| SEM | AVA00715 | M6G027B | 5/5/13 | Negativo | 33.06 | Intermedio | Negativo | Positivo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| SEM | AVA00717 | M6G033B | 5/5/13 | P.falciparum | 28.43 | Temprano | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00719 | M6G012A | 5/5/13 | Negativo | 30.64 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Positivo |
| SEM | AVA00765 | M6G036D | 6/5/13 | P.falciparum | 28.25 | Temprano | Negativo | Positivo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00778 | M6G002F | 26/5/13 | P.falciparum | 29.01 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00864 | M6G027A | 26/5/13 | Negativo | 32.51 | Intermedio | Positivo | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00913 | M6G007A | 16/6/13 | P.falciparum | 32.58 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo | Negativo | Negativo |
| SEM | AVA00924 | M6G002A | 16/6/13 | Negativo | 33.18 | Intermedio | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Negativo |
| SEM | AVA00936 | M6G004A | 16/6/13 | Negativo | 33.21 | Intermedio | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo | Negativo | Negativo |
| SEM | AVA00948 | M6G009A | 16/6/13 | P.falciparum | 27.93 | Temprano | Negativo | Positivo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00950 | M6G009D | 16/6/13 | P.vivax | 31.59 | Intermedio | Negativo | Positivo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA00956 | M6G006G | 16/6/13 | P.falciparum | 23.55 | Temprano | Negativo | Positivo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA01000 | M6G011I | 17/6/13 | P.falciparum | 27.34 | Temprano | Negativo | Positivo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA01005 | M6G013E | 17/6/13 | Negativo | 33.07 | Intermedio | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo | Negativo | Negativo |
| SEM | AVA01007 | M6G015A | 17/6/13 | Negativo | 33.24 | Intermedio | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA01051 | M6G025D | 16/6/13 | Negativo | 33.48 | Intermedio | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo | Negativo | Positivo |
| SEM | AVA01073 | M6G020F | 17/6/13 | Negativo | 33.44 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA01077 | M6G008E | 16/6/13 | Negativo | 32.3 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA01090 | M6G015A | 7/7/13 | P.falciparum | 29.18 | Intermedio | Negativo | Positivo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA01103 | M6G007A | 7/7/13 | ND | 30.35 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA01116 | M6G002H | 7/7/13 | P.vivax | 33.02 | Intermedio | Negativo | Positivo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA01217 | M6G014D | 7/7/13 | P.falciparum | 26.96 | Temprano | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA01273 | M6G004A | 18/8/13 | Negativo | 31.53 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA01302 | M6G026A | 18/8/13 | Negativo | 30.78 | Intermedio | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA01516 | M6G019B | 22/9/13 | P.falciparum | 30.02 | Intermedio | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| SEM | AVA01762 | M6G035B | 17/11/13 | Negativo | 28.72 | Temprano | Positivo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |

ANEXO 2

Lista de cebadores para diagnóstico molecular de malaria (qPCR-18S rRNA)

| Nombre del cebador | Secuencia (5'-3') |
|--------------------|------------------------|
| PL1473F18 | 5-TAACGAACGAGATCTTAA-3 |
| PL1679R18 | 5-GTTCCTCTAAGAAGCTTT-3 |

ANEXO 3

Lista de las secuencias de cebadores y tamaños del producto esperado de la amplificación por PCR convencional de los genes *pfhrp2*, *pfhrp3* y flanqueantes de *P.falciparum*

| Gen | Nombre del cebador | Secuencia del cebador (5'-3') | Temperatura de hibridación | Amplicón en pb |
|----------------|--------------------------|---|----------------------------|----------------|
| Pfhrp2- Exon 2 | Pfhrp2 FOR Phrp2 REV | 5' GATTATTACACGAAACTCAAGC 3' 5' AATAAATTTAATGGCGTAGGC 3' | 54°C | 785 |
| Pfhrp3-Exon 2 | Pfhrp3 FOR Pfhrp3 REV | 5' AAATAAGAGATTATTACACGAAAG 3' 5' TGGTGTAAGTGATGCGTAGT 3' | 54°C | 719 |
| PF3D7_0831700 | 914555 914556 | 5' AGACAAGCTACCAAAGATGCAGGTG 3' 5' TAAATGTGTATCTCCTGAGGTAGC 3' | 60°C | 227 |
| PF3D7_0831900 | 914516 914517 | 5' TATGAACGCAATTTAAGTGAGGCAG 3' 5' TATCAATCCTTCCTTTGCAACACC 3' | 65°C | 346 |
| PF3D7_1372100 | 914518 914519 | 5' TTCATGAGTAGATGTCCTAGGAG 3' 5' TCGTACAATTCATCATACTCACC 3' | 61°C | 260 |
| PF3D7_1372400 | 914520 914521 | 5' TTGAGTGCAATGATGAGTGGAG 3' 5' AAATCATTCCTTTTACACTAGTGC 3' | 61°C | 287 |

ANEXO 4

Representatividad de muestras analizadas y no analizadas de *P.falciparum* en el estudio

| | Muestras <i>P.falciparum</i> (qPCR+) analizadas en prevalencia de <i>pfhrp2/3</i> | | Muestras <i>P.falciparum</i> (qPCR+) no analizadas (baja parasitemia) | |
|------------------|---|------------|---|------------|
| Patencia | GG+ | GG- | GG+ | GG- |
| CAH | 6 | 70 | 0 | 143 |
| LUP | 18 | 40 | 0 | 88 |
| SEM | 39 | 54 | 3 | 82 |
| Total (n) | 63 | 164 | 3 | 313 |

GG+: gota gruesa positivo

GG-: gota gruesa negativo

| Patencia | GG+/qPCR+ | GG-/qPCR+ | Total |
|--------------------|------------------|------------------|--------------|
| Población N=543 | 66 0.12 | 477 | 543 |
| Muestra n=227 | 63 0.28 | 164 | 227 |
| Proporción n/N | 2.28 | | |

ANEXO 6

Condiciones de ciclado de PCR convencional para la amplificación de los genes *pfhrp2*, *pfhrp3* y flanqueantes de *P.falciparum*

| | | <i>pfhrp2</i>-Exon2 | <i>pfhrp3</i>-Exon2 | PF3D7_0831700 | PF3D7_0831900 | PF3D7_1372100 | PF3D7_1372400 |
|--------|----------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Paso 1 | Denaturación inicial | 95°C x 4min | 95°C x 4min | 95°C x 5min | 95°C x 5min | 95°C x 5min | 95°C x 5min |
| Paso 2 | Denaturación | 95°C x 50seg | 95°C x 50seg | 95°C x 30seg | 94°C x 30seg | 94°C x 35seg | 94°C x 35seg |
| Paso 3 | Hibridación | 54°C x 30seg | 54°C x 30seg | 60°C x 30seg | 65°C x 30seg | 61°C x 40seg | 61°C x 40seg |
| Paso 4 | Extensión | 72°C x 1min | 72°C x 1min | 68°C x 1min | 68°C x 1min | 72°C x 40seg | 72°C x 40seg |
| Paso 5 | Ciclos | 2-4 x 35 ciclos | 2-4 x 35 ciclos | 2-4 x 35 ciclos | 2-4 x 35 ciclos | 2-4 x 35 ciclos | 2-4 x 35 ciclos |
| Paso 6 | Extensión final | 72°C x 10min | 72°C x 10min | 68°C x 5min | 68°C x 6min | 72°C x 7min | 72°C x 7min |

ANEXO 7

Características del panel de 20 marcadores microsatélites de *P.falciparum*

| Loci | Cromosoma | N° acceso GenBank | Motivo de repetición | Cebador Fwd (5'-3') | Cebador Rev (5'-3') | Fluoróforo |
|--------|-----------|-------------------|---|--------------------------|------------------------|-------------------|
| C1M8 | 1 | G38013 | (AAT) ₉₋₁₂ | AGTATTATTATTACCACTACT | GAAGGCTAATACAATTGGTA | NED TM |
| POLYA | 4 | L18785 | (AAT) ₈₋₁₃ | AAAATATAGACGAACAGA | ATCAGATAATTGTTGGTA | NED TM |
| TA81 | 5 | AF010510 | (AAT) ₇₋₈ | TGGACAAATGGGAAAGGATA | TTTCACACAACACAGGATT | PET TM |
| TAA42 | 5 | AF010543.1 | (AT) ₄ / (TAT) ₁₈₋₂₄ | GTATTATTACTACTACTAAAG | ACAAAAGGGTGGTGATTCT | VIC TM |
| TA1 | 6 | AF010507 | (AAT) ₇₋₉ | CCGTCATAAGTGCAGAGC | TTTTATCTTCATCCCCAC | NED TM |
| TA87 | 6 | AF010571 | (AAC) ₇₋₁₁ / (AAT) ₉₋₁₂ | AATGGCAACACCATTCAAC | ACATGTTTCATATTACTCAC | PET TM |
| 2490 | 10 | G37790.1 | (AAT) ₆₋₈ | GCAGCACAAAAAGAAATAC | GACGAATTATTAGAATGTCTG | PET TM |
| ARA2 | 11 | X17484 | (TTA) ₈₋₁₃ | GAATAAACAAAGTATTGCT | GCTTTGAGTATTATTAATA | PET TM |
| PfPK2 | 12 | X63648 | (AAT) ₈₋₁₅ | CTTTCATCGATACTACGA | AAAGAAGGAACAAGCAGA | FAM TM |
| Pfg377 | 12 | L04161 | (AAT) ₇₋₁₅ | GATCTCAACGGAAATTAT | TTATCCCTACGATTAACA | PET TM |
| TA60 | 13 | AF010556 | (AAT) ₁₁₋₂₀ | CTCAAAGAAAAATAATTCA | AAAAAGGAGGATAAATACAT | NED TM |
| C2M21 | 2 | G37882.1 | (TA) ₁₁ | TGCCATTTCTTATACATACCA | TTTTCTGTTGCATTGTAATA | FAM TM |
| C2M22 | 2 | G37881.1 | (TA) ₁₀ | AAAGGTTACCAAAATTCTAAAA | AAACATGAATCATAGAGAAAA | VIC TM |
| KAHRP | 2 | J02972.1 | (AT) ₁₁ | ACTCTTTTCTGTATAAACGTCA | TTTATTAAGACGTATTTAAGCA | FAM TM |
| B7M66 | 5 | G42782.2 | (AT) ₁₇ | TATATTTTTACAGGTTGTAT | ACAGGAATAAATGGATATG | VIC TM |
| PF2802 | 5 | G37818.1 | (TA) ₁₂ | ATATGTATAAAAGGAAATACC | GATATACCCTCAGAGAAAT | NED TM |
| B5M63 | 6 | G42791.1 | (AT) ₈ | ATATTCTTTTTAGAATGTTGC | TCGTCTAATTTCCATTCCAT | VIC TM |
| TA24 | 6 | AF010535.1 | (TA) ₁₅ | CAAACATAATTCTTTTACTGTGT | AGGTTTTCTTTTACATCCAGCA | VIC TM |
| XB8M30 | 11 | G44555.1 | (AT) ₂₃ | TTTTCACAGATACATAAATA | ATTACAAAATGATTCCACAC | FAM TM |
| XB8M6 | 11 | G44554.1 | (TA) ₂₂ | CTTCATTCTTTAATAAATACTTGT | AGGATATGTAGAACTATAAAA | FAM TM |

ANEXO 8

Condiciones de master mix de PCR convencional para la amplificación de marcadores de *P.falciparum*

| Microsatélites | Reactivo de PCR | Concentración inicial | Concentración final | Volumen por reacción |
|----------------|---|-----------------------|---------------------|----------------------|
| ARA2 | H2O PCR Buffer 10X MgCl ₂ dNTPs Cebador F Cebador R Taq HotStar DNA | | | 12.175 µl |
| TA60 | | | | 2.5 µl |
| TAA42 | | 10X | 1X | 0.5 µl |
| C1M8 | | 25 mM | 2 mM | 1 µl |
| PfG377 | | 10 mM | 0.4 mM | 0.3125 µM |
| TA87 | | 20 µM | 0.25 µM | 0.3125 µM |
| 2490 | | 20 µM | 0.25 µM | 0.2 µl |
| PfPK2 | | 5 U | 1 U | 8 µl |
| XB8M6 | | - | - | |
| Pf2802 | | | | |
| TA24 | | | | |
| Volumen final | | | 25 µl | |

ANEXO 9

Condiciones de ciclado de PCR convencional para la amplificación de marcadores de *P.falciparum*

| Microsatélites | Denaturación inicial | Ciclado | N° ciclos | Extensión final |
|----------------------------|-----------------------------|---|------------------|------------------------|
| ARA2, TA60 PfG377, TA87 | 95°C x 5min | 94°C x 30 seg; 47°C x 20 seg; 65°C x 20 seg | 40 | 65°C x 5min |
| TAA42, C1M8 | 95°C x 5min | 94°C x 30 seg; 50°C x 20 seg; 65°C x 20 seg | 40 | 65°C x 5min |
| 2490, PfPK2 | 95°C x 5min | 94°C x 30 seg; 52°C x 20 seg; 65°C x 20 seg | 40 | 65°C x 5min |

ANEXO 10

Condiciones de master mix de nested PCR (nPCR) para la amplificación de marcadores de *P.falciparum*

| Microsatélites | Reactivo de PCR | Primera reacción | | Volumen por reacción |
|---|--------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|
| | | Concentración inicial | Concentración final | |
| TA81 PolyA B7M66 B5M63 C2M22 C2M21 | H2O PCR | | | 15.5875 µl |
| | Buffer 10X | 10X | 1X | 2.5 µl |
| | MgCl2 | 25 mM | 2 mM | 0.5 µl |
| | dNTPs | 10 mM | 0.4 mM | 1 µl |
| | Cebador F | 20 µM | 0.25 µM | 0.15625 µM |
| | Cebador R | 20 µM | 0.25 µM | 0.15625 µM |
| | Taq HotStar DNA | 5 U - | 1 U - | 0.1 µl 5 µl |
| Volumen final | | | 25 µl | |

| Microsatélites | Reactivo de PCR | Segunda reacción | | Volumen por reacción |
|---|--------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|
| | | Concentración inicial | Concentración final | |
| TA81 PolyA B7M66 B5M63 C2M22 C2M21 | H2O PCR | | | 15.5875 µl |
| | Buffer 10X | 10X | 1X | 2.5 µl |
| | MgCl2 | 25 mM | 2 mM | 0.5 µl |
| | dNTPs | 10 mM | 0.4 mM | 1 µl |
| | Cebador F | 20 µM | 0.25 µM | 0.15625 µM |
| | Cebador R | 20 µM | 0.25 µM | 0.15625 µM |
| | Taq HotStar DNA | 5 U - | 1 U - | 0.1 µl 2 µl |
| Volumen final | | | 25 µl | |

ANEXO 11

Condiciones de ciclado de nested PCR (nPCR) para la amplificación de marcadores de *P.falciparum*

| Microsatélites | Reacción | Denaturación inicial | Ciclado | Nº ciclos | Extensión final |
|---|--------------------------------------|----------------------------|---|-----------|------------------|
| TA81 PolyA B7M66 B5M63 C2M21 C2M22 | Primera reacción Segunda reacción | 95°C x 5min 95°C x 5min | 94°C x 30 seg; 52°C x 20 seg (-0.5°C/ciclo); 65°C x 20 seg 94°C x 30 seg; 47°C x 20 seg; 65°C x 20 seg | 25 35 | - 72°C x 5min |

ANEXO 12

Condiciones de master mix de nested PCR (nPCR) modificado para la amplificación de marcadores de *P.falciparum*

| Microsatélites | Reactivo de PCR | Primera reacción | | Volumen por reacción |
|------------------------|-----------------|-----------------------|---------------------|----------------------|
| | | Concentración inicial | Concentración final | |
| TA1 XB8M30 KAHRP | H2O PCR | | | 12.5875 µl |
| | Buffer 10X | 10X | 1X | 2.5 µl |
| | MgCl2 | 25 mM | 2 mM | 0.5 µl |
| | dNTPs | 10 mM | 0.4 mM | 1 µl |
| | Cebador F | 20 µM | 0.25 µM | 0.15625 µM |
| | Cebador R | 20 µM | 0.25 µM | 0.15625 µM |
| | Taq HotStar | 5 U | 1 U | 0.1 µl |
| DNA | - | - | 8 µl | |
| | | Volumen final | | 25 µl |

| Microsatélites | Reactivo de PCR | Segunda reacción | | Volumen por reacción |
|------------------------|-----------------|-----------------------|---------------------|----------------------|
| | | Concentración inicial | Concentración final | |
| TA1 XB8M30 KAHRP | H2O PCR | | | 18.5875 µl |
| | Buffer 10X | 10X | 1X | 2.5 µl |
| | MgCl2 | 25 mM | 2 mM | 0.5 µl |
| | dNTPs | 10 mM | 0.4 mM | 1 µl |
| | Cebador F | 20 µM | 0.25 µM | 0.15625 µM |
| | Cebador R | 20 µM | 0.25 µM | 0.15625 µM |
| | Taq HotStar | 5 U | 1 U | 0.1 µl |
| DNA | - | - | 2 µl | |
| | | Volumen final | | 25 µl |

ANEXO 13

Condiciones de ciclado de nested PCR modificado para la amplificación de marcadores de *P.falciparum*

| Microsatélites | Reacción | Denaturación inicial | Ciclado | Nº ciclos | Extensión final |
|----------------|------------------|----------------------|--|-----------|-----------------|
| XB8M30 | Primera reacción | 95°C x 5min | 94°C x 30 seg; 50°C x 20 seg (-0.5°C/ciclo); 65°C x 20 seg | 25 | - |
| KAHRP | Segunda reacción | 95°C x 5min | 94°C x 30 seg; 47°C x 20 seg; 65°C x 20 seg | 35 | 72°C x 5min |

ANEXO 14

Base de haplotipos basados en 5 marcadores microsatélites incluidas en el análisis de diversidad y estructura poblacional de *P.falciparum*

| Cód.Muestra | Comunidad | ARA2 | C1M8 | TA81 | 2490 | KAHRP |
|--------------------|------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| AC002654 | CAH | 65 | 180 | 94 | 154 | 162 |
| AC002748 | CAH | 65 | 186 | 94 | 151 | 157 |
| AC003083 | CAH | 65 | 183 | 94 | 151 | 0 |
| AC005334 | CAH | 65 | 186 | 94 | 151 | 157 |
| AC005337 | CAH | 65 | 186 | 94 | 151 | 157 |
| AC005339 | CAH | 65 | 186 | 94 | 151 | 157 |
| AC005346 | CAH | 0 | 0 | 94 | 151 | 0 |
| AC005411 | CAH | 65 | 186 | 94 | 151 | 157 |
| AC005412 | CAH | 65 | 186 | 94 | 151 | 157 |
| AC005413 | CAH | 65 | 0 | 0 | 151 | 157 |
| AC005697 | CAH | 65 | 0 | 94 | 151 | 157 |
| AC005700 | CAH | 65 | 186 | 94 | 151 | 157 |
| AC005725 | CAH | 65 | 186 | 94 | 151 | 157 |
| AC005751 | CAH | 65 | 186 | 94 | 151 | 157 |
| AC012331 | CAH | 65 | 0 | 94 | 151 | 0 |
| AC012333 | CAH | 65 | 186 | 94 | 0 | 0 |
| AC012360 | CAH | 65 | 0 | 0 | 0 | 157 |
| AC012365 | CAH | 61 | 180 | 94 | 151 | 0 |
| AC012434 | CAH | 65 | 180 | 94 | 0 | 0 |
| AC012476 | CAH | 61 | 200 | 94 | 151 | 0 |
| AC012497 | CAH | 65 | 0 | 94 | 151 | 0 |
| AC014908 | CAH | 65 | 188 | 94 | 149 | 157 |
| AC014914 | CAH | 65 | 180 | 98 | 0 | 0 |
| AC015099 | CAH | 61 | 180 | 94 | 0 | 0 |
| AC015104 | CAH | 71 | 203 | 94 | 0 | 0 |
| AC015388 | CAH | 61 | 180 | 94 | 0 | 0 |
| AC015401 | CAH | 65 | 180 | 98 | 0 | 0 |
| AC015402 | CAH | 61 | 180 | 94 | 0 | 0 |
| AC020135 | CAH | 65 | 200 | 98 | 0 | 0 |
| AL000661 | LUP | 65 | 186 | 94 | 151 | 157 |
| AL000691 | LUP | 65 | 186 | 0 | 151 | 157 |
| AL000732 | LUP | 65 | 186 | 94 | 151 | 0 |

| | | | | | | |
|----------|-----|----|-----|-----|-----|-----|
| AL000919 | LUP | 65 | 186 | 94 | 151 | 157 |
| AL002119 | LUP | 0 | 0 | 94 | 151 | 157 |
| AL004452 | LUP | 65 | 186 | 94 | 151 | 157 |
| AL007686 | LUP | 65 | 186 | 94 | 0 | 0 |
| AL007860 | LUP | 65 | 186 | 94 | 151 | 157 |
| AL007862 | LUP | 65 | 186 | 0 | 151 | 157 |
| AL008139 | LUP | 65 | 0 | 94 | 151 | 157 |
| AL008140 | LUP | 65 | 186 | 94 | 151 | 157 |
| AL008170 | LUP | 65 | 186 | 94 | 151 | 157 |
| AL008241 | LUP | 65 | 183 | 98 | 0 | 0 |
| AL010105 | LUP | 65 | 186 | 107 | 0 | 0 |
| AL010707 | LUP | 61 | 183 | 94 | 0 | 0 |
| AL010771 | LUP | 65 | 183 | 94 | 0 | 0 |
| AL010988 | LUP | 65 | 186 | 94 | 151 | 157 |
| AL013360 | LUP | 65 | 180 | 94 | 154 | 162 |
| AL015482 | LUP | 65 | 180 | 94 | 154 | 162 |
| AL016314 | LUP | 65 | 180 | 94 | 154 | 162 |
| AL018388 | LUP | 65 | 180 | 94 | 154 | 162 |
| AL018631 | LUP | 65 | 180 | 94 | 154 | 0 |
| AL018679 | LUP | 0 | 0 | 94 | 154 | 162 |
| AL018688 | LUP | 65 | 180 | 94 | 154 | 0 |
| AL018955 | LUP | 65 | 0 | 98 | 154 | 162 |
| AVA00010 | SEM | 65 | 186 | 112 | 151 | 157 |
| AVA00011 | SEM | 65 | 0 | 98 | 154 | 162 |
| AVA00012 | SEM | 65 | 186 | 112 | 151 | 157 |
| AVA00013 | SEM | 65 | 180 | 98 | 154 | 162 |
| AVA00017 | SEM | 65 | 186 | 112 | 151 | 157 |
| AVA00025 | SEM | 65 | 186 | 112 | 154 | 157 |
| AVA00027 | SEM | 65 | 0 | 98 | 151 | 157 |
| AVA00040 | SEM | 65 | 186 | 112 | 151 | 157 |
| AVA00054 | SEM | 65 | 0 | 98 | 154 | 162 |
| AVA00056 | SEM | 65 | 180 | 112 | 0 | 160 |
| AVA00062 | SEM | 65 | 180 | 98 | 154 | 162 |
| AVA00084 | SEM | 65 | 186 | 112 | 0 | 0 |
| AVA00086 | SEM | 65 | 186 | 112 | 0 | 0 |
| AVA00098 | SEM | 65 | 0 | 112 | 151 | 157 |
| AVA00134 | SEM | 65 | 0 | 98 | 0 | 0 |
| AVA00145 | SEM | 65 | 180 | 98 | 154 | 162 |
| AVA00146 | SEM | 65 | 180 | 98 | 154 | 162 |
| AVA00152 | SEM | 65 | 186 | 112 | 151 | 157 |
| AVA00161 | SEM | 65 | 180 | 98 | 154 | 162 |

| | | | | | | |
|----------|-----|----|-----|-----|-----|-----|
| AVA00162 | SEM | 65 | 186 | 112 | 151 | 157 |
| AVA00172 | SEM | 65 | 180 | 98 | 154 | 162 |
| AVA00173 | SEM | 65 | 186 | 112 | 151 | 157 |
| AVA00177 | SEM | 65 | 186 | 112 | 0 | 0 |
| AVA00232 | SEM | 65 | 180 | 98 | 154 | 162 |
| AVA00264 | SEM | 0 | 0 | 112 | 151 | 157 |
| AVA00280 | SEM | 65 | 180 | 98 | 154 | 162 |
| AVA00286 | SEM | 65 | 0 | 98 | 154 | 162 |
| AVA00319 | SEM | 65 | 0 | 112 | 0 | 157 |
| AVA00323 | SEM | 65 | 186 | 112 | 151 | 157 |
| AVA00327 | SEM | 65 | 186 | 112 | 151 | 157 |
| AVA00381 | SEM | 65 | 180 | 98 | 154 | 162 |
| AVA00400 | SEM | 65 | 186 | 112 | 0 | 0 |
| AVA00401 | SEM | 65 | 186 | 98 | 154 | 157 |
| AVA00449 | SEM | 65 | 186 | 112 | 151 | 157 |
| AVA00455 | SEM | 65 | 186 | 112 | 0 | 0 |
| AVA00466 | SEM | 65 | 0 | 112 | 151 | 157 |
| AVA00484 | SEM | 65 | 180 | 98 | 154 | 162 |
| AVA00523 | SEM | 65 | 186 | 112 | 151 | 157 |
| AVA00573 | SEM | 65 | 180 | 98 | 154 | 162 |
| AVA00575 | SEM | 0 | 0 | 112 | 151 | 157 |
| AVA00580 | SEM | 0 | 0 | 112 | 151 | 162 |
| AVA00584 | SEM | 65 | 180 | 98 | 154 | 0 |
| AVA00595 | SEM | 65 | 0 | 94 | 151 | 157 |
| AVA00598 | SEM | 0 | 0 | 98 | 151 | 157 |
| AVA00604 | SEM | 65 | 180 | 98 | 154 | 162 |
| AVA00642 | SEM | 65 | 186 | 112 | 151 | 157 |
| AVA00686 | SEM | 65 | 186 | 112 | 151 | 157 |
| AVA00717 | SEM | 65 | 0 | 112 | 154 | 162 |
| AVA00719 | SEM | 65 | 0 | 98 | 154 | 160 |
| AVA00765 | SEM | 65 | 0 | 112 | 151 | 0 |
| AVA00778 | SEM | 65 | 0 | 112 | 151 | 157 |
| AVA00948 | SEM | 0 | 0 | 98 | 154 | 162 |
| AVA00956 | SEM | 65 | 186 | 98 | 154 | 162 |
| AVA01000 | SEM | 65 | 186 | 112 | 151 | 0 |
| AVA01007 | SEM | 0 | 0 | 98 | 151 | 0 |
| AVA01090 | SEM | 65 | 186 | 98 | 154 | 162 |
| AVA01302 | SEM | 65 | 180 | 98 | 0 | 0 |
| AVA01516 | SEM | 65 | 186 | 112 | 151 | 157 |

ANEXO 15

Análisis de Inferencia Bayesiana en la determinación de la estructura poblacional putativa con cinco marcadores microsatélites de *P.falciparum*.

| Cód.muestra | Comunidad | PCR | | Análisis total K=2 | | Análisis total K=4 | | | |
|-------------|-----------|---------------|---------------|--------------------|-----------|--------------------|-----------|-----------|-----------|
| | | <i>pfhrp2</i> | <i>pfhrp3</i> | Cluster 1 | Cluster 2 | Cluster 1 | Cluster 2 | Cluster 3 | Cluster 4 |
| AC002654 | CAH | Negativo | Negativo | 0.9735 | 0.0265 | 0.8893 | 0.0223 | 0.0713 | 0.0171 |
| AC003083 | CAH | Positivo | Positivo | 0.664 | 0.336 | 0.0225 | 0.1193 | 0.7802 | 0.0780 |
| AC012365 | CAH | Positivo | Negativo | 0.8752 | 0.1248 | 0.0368 | 0.0327 | 0.9050 | 0.0255 |
| AC012434 | CAH | Negativo | Negativo | 0.9169 | 0.0831 | 0.5732 | 0.0701 | 0.3088 | 0.0479 |
| AC012476 | CAH | Negativo | Negativo | 0.8675 | 0.1325 | 0.0132 | 0.0301 | 0.9327 | 0.0240 |
| AC014908 | CAH | Positivo | Positivo | 0.7312 | 0.2688 | 0.0143 | 0.0389 | 0.9168 | 0.0300 |
| AC014914 | CAH | Negativo | Positivo | 0.9638 | 0.0362 | 0.8719 | 0.0222 | 0.0838 | 0.0221 |
| AC015099 | CAH | Negativo | Positivo | 0.9621 | 0.0379 | 0.0846 | 0.0256 | 0.8689 | 0.0209 |
| AC015104 | CAH | Negativo | Positivo | 0.9336 | 0.0664 | 0.0183 | 0.0241 | 0.9375 | 0.0201 |
| AC015388 | CAH | Negativo | Negativo | 0.9621 | 0.0379 | 0.0851 | 0.0255 | 0.8686 | 0.0208 |
| AC015401 | CAH | Negativo | Positivo | 0.9638 | 0.0362 | 0.8716 | 0.0219 | 0.0844 | 0.0221 |
| AC015402 | CAH | Negativo | Positivo | 0.9621 | 0.0379 | 0.0856 | 0.0256 | 0.8677 | 0.0211 |
| AC020135 | CAH | Negativo | Negativo | 0.9606 | 0.0394 | 0.1551 | 0.0269 | 0.7916 | 0.0264 |
| AL008241 | LUP | Negativo | Negativo | 0.9569 | 0.0431 | 0.1679 | 0.0319 | 0.7711 | 0.0291 |
| AL010105 | LUP | Negativo | Negativo | 0.5413 | 0.4587 | 0.0287 | 0.1389 | 0.6967 | 0.1357 |
| AL010707 | LUP | Negativo | Negativo | 0.9548 | 0.0452 | 0.0194 | 0.0272 | 0.9317 | 0.0217 |
| AL010771 | LUP | Negativo | Negativo | 0.8685 | 0.1315 | 0.0507 | 0.0949 | 0.7924 | 0.0620 |
| AL013360 | LUP | Negativo | Negativo | 0.974 | 0.026 | 0.8912 | 0.0221 | 0.0697 | 0.0170 |
| AL015482 | LUP | Positivo | Negativo | 0.9735 | 0.0265 | 0.8910 | 0.0222 | 0.0697 | 0.0171 |
| AL016314 | LUP | Negativo | Negativo | 0.9737 | 0.0263 | 0.8904 | 0.0220 | 0.0703 | 0.0173 |
| AL018388 | LUP | Negativo | Negativo | 0.9738 | 0.0262 | 0.8902 | 0.0223 | 0.0705 | 0.0170 |

| | | | | | | | | | |
|----------|-----|----------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| AL018631 | LUP | Negativo | Negativo | 0.9602 | 0.0398 | 0.7947 | 0.0341 | 0.1460 | 0.0252 |
| AL018679 | LUP | Negativo | Negativo | 0.9623 | 0.0377 | 0.7748 | 0.0327 | 0.1683 | 0.0242 |
| AL018688 | LUP | Negativo | Negativo | 0.9598 | 0.0402 | 0.7967 | 0.0340 | 0.1442 | 0.0252 |
| AL018955 | LUP | Negativo | Negativo | 0.9757 | 0.0243 | 0.9345 | 0.0149 | 0.0356 | 0.0150 |
| AVA00011 | SEM | Negativo | Negativo | 0.9757 | 0.0243 | 0.9358 | 0.0150 | 0.0342 | 0.0150 |
| AVA00013 | SEM | Negativo | Negativo | 0.9817 | 0.0183 | 0.9561 | 0.0110 | 0.0215 | 0.0114 |
| AVA00054 | SEM | Negativo | Negativo | 0.9756 | 0.0244 | 0.9341 | 0.0149 | 0.0360 | 0.0150 |
| AVA00056 | SEM | Positivo | Negativo | 0.8448 | 0.1552 | 0.0803 | 0.0463 | 0.8059 | 0.0676 |
| AVA00062 | SEM | Negativo | Negativo | 0.9818 | 0.0182 | 0.9560 | 0.0112 | 0.0216 | 0.0112 |
| AVA00134 | SEM | Negativo | Negativo | 0.9157 | 0.0843 | 0.7269 | 0.0463 | 0.1811 | 0.0457 |
| AVA00145 | SEM | Negativo | Negativo | 0.9817 | 0.0183 | 0.9564 | 0.0112 | 0.0213 | 0.0111 |
| AVA00146 | SEM | Positivo | Positivo | 0.9816 | 0.0184 | 0.9565 | 0.0113 | 0.0211 | 0.0111 |
| AVA00161 | SEM | Negativo | Negativo | 0.9819 | 0.0181 | 0.9566 | 0.0112 | 0.0211 | 0.0111 |
| AVA00172 | SEM | Positivo | Positivo | 0.9815 | 0.0185 | 0.9563 | 0.0111 | 0.0214 | 0.0112 |
| AVA00232 | SEM | Negativo | Negativo | 0.9816 | 0.0184 | 0.9562 | 0.0113 | 0.0214 | 0.0111 |
| AVA00280 | SEM | Negativo | Negativo | 0.9816 | 0.0184 | 0.9563 | 0.0112 | 0.0213 | 0.0112 |
| AVA00286 | SEM | Negativo | Negativo | 0.9756 | 0.0244 | 0.9352 | 0.0150 | 0.0348 | 0.0150 |
| AVA00381 | SEM | Negativo | Negativo | 0.9817 | 0.0183 | 0.9555 | 0.0111 | 0.0220 | 0.0114 |
| AVA00401 | SEM | Positivo | Positivo | 0.6343 | 0.3657 | 0.3476 | 0.1788 | 0.2944 | 0.1791 |
| AVA00484 | SEM | Positivo | Negativo | 0.9816 | 0.0184 | 0.9562 | 0.0111 | 0.0214 | 0.0113 |
| AVA00573 | SEM | Negativo | Negativo | 0.9818 | 0.0182 | 0.9571 | 0.0111 | 0.0207 | 0.0111 |
| AVA00584 | SEM | Negativo | Negativo | 0.9757 | 0.0243 | 0.9320 | 0.0150 | 0.0380 | 0.0150 |
| AVA00604 | SEM | Negativo | Positivo | 0.9816 | 0.0184 | 0.9566 | 0.0111 | 0.0211 | 0.0112 |
| AVA00717 | SEM | Positivo | Negativo | 0.8476 | 0.1524 | 0.5207 | 0.0917 | 0.2334 | 0.1543 |
| AVA00719 | SEM | Negativo | Negativo | 0.9752 | 0.0248 | 0.3654 | 0.0173 | 0.6001 | 0.0172 |
| AVA00948 | SEM | Negativo | Positivo | 0.9767 | 0.0233 | 0.9250 | 0.0149 | 0.0451 | 0.0150 |
| AVA00956 | SEM | Negativo | Positivo | 0.8969 | 0.1031 | 0.6912 | 0.0920 | 0.1247 | 0.0921 |
| AVA01007 | SEM | Positivo | Negativo | 0.732 | 0.268 | 0.2000 | 0.1158 | 0.5699 | 0.1143 |
| AVA01090 | SEM | Negativo | Positivo | 0.8973 | 0.1027 | 0.6914 | 0.0926 | 0.1238 | 0.0922 |

| | | | | | | | | | |
|----------|-----|----------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| AVA01302 | SEM | Positivo | Negativo | 0.9635 | 0.0365 | 0.8712 | 0.0221 | 0.0845 | 0.0222 |
| AC002748 | CAH | Positivo | Positivo | 0.0245 | 0.9755 | 0.0130 | 0.5954 | 0.0520 | 0.3396 |
| AC005334 | CAH | Positivo | Positivo | 0.0245 | 0.9755 | 0.0131 | 0.5933 | 0.0540 | 0.3396 |
| AC005337 | CAH | Positivo | Positivo | 0.0245 | 0.9755 | 0.0130 | 0.5936 | 0.0534 | 0.3400 |
| AC005339 | CAH | Positivo | Positivo | 0.0247 | 0.9753 | 0.0130 | 0.5934 | 0.0532 | 0.3403 |
| AC005346 | CAH | Positivo | Positivo | 0.1367 | 0.8633 | 0.0310 | 0.4534 | 0.2538 | 0.2617 |
| AC005411 | CAH | Positivo | Positivo | 0.0246 | 0.9754 | 0.0130 | 0.5929 | 0.0552 | 0.3389 |
| AC005412 | CAH | Positivo | Positivo | 0.0244 | 0.9756 | 0.0130 | 0.5933 | 0.0535 | 0.3402 |
| AC005413 | CAH | Positivo | Positivo | 0.0461 | 0.9539 | 0.0222 | 0.4273 | 0.1237 | 0.4268 |
| AC005697 | CAH | Positivo | Positivo | 0.0417 | 0.9583 | 0.0184 | 0.5421 | 0.1310 | 0.3085 |
| AC005700 | CAH | Positivo | Positivo | 0.0246 | 0.9754 | 0.0130 | 0.5942 | 0.0530 | 0.3398 |
| AC005725 | CAH | Positivo | Positivo | 0.0244 | 0.9756 | 0.0131 | 0.5936 | 0.0530 | 0.3403 |
| AC005751 | CAH | Positivo | Positivo | 0.0243 | 0.9757 | 0.0130 | 0.5933 | 0.0540 | 0.3397 |
| AC012331 | CAH | Negativo | Positivo | 0.1226 | 0.8774 | 0.0325 | 0.4902 | 0.1934 | 0.2839 |
| AC012333 | CAH | Positivo | Positivo | 0.096 | 0.904 | 0.0339 | 0.5460 | 0.1025 | 0.3176 |
| AC012360 | CAH | Negativo | Positivo | 0.1147 | 0.8853 | 0.0430 | 0.3964 | 0.1624 | 0.3981 |
| AC012497 | CAH | Negativo | Positivo | 0.1216 | 0.8784 | 0.0320 | 0.4911 | 0.1950 | 0.2819 |
| AL000661 | LUP | Positivo | Positivo | 0.0243 | 0.9757 | 0.0130 | 0.5945 | 0.0531 | 0.3394 |
| AL000691 | LUP | Positivo | Positivo | 0.0262 | 0.9738 | 0.0150 | 0.4675 | 0.0499 | 0.4676 |
| AL000732 | LUP | Positivo | Positivo | 0.0409 | 0.9591 | 0.0184 | 0.5745 | 0.0761 | 0.3310 |
| AL000919 | LUP | Positivo | Positivo | 0.0245 | 0.9755 | 0.0130 | 0.5933 | 0.0539 | 0.3398 |
| AL002119 | LUP | Positivo | Positivo | 0.0446 | 0.9554 | 0.0180 | 0.5151 | 0.1738 | 0.2931 |
| AL004452 | LUP | Positivo | Positivo | 0.0245 | 0.9755 | 0.0131 | 0.5923 | 0.0534 | 0.3413 |
| AL007686 | LUP | Positivo | Positivo | 0.0949 | 0.9051 | 0.0342 | 0.5445 | 0.1045 | 0.3168 |
| AL007860 | LUP | Positivo | Positivo | 0.0245 | 0.9755 | 0.0131 | 0.5941 | 0.0538 | 0.3390 |
| AL007862 | LUP | Positivo | Positivo | 0.026 | 0.974 | 0.0151 | 0.4683 | 0.0498 | 0.4669 |
| AL008139 | LUP | Positivo | Positivo | 0.0413 | 0.9587 | 0.0183 | 0.5397 | 0.1314 | 0.3106 |
| AL008140 | LUP | Positivo | Positivo | 0.0245 | 0.9755 | 0.0131 | 0.5932 | 0.0539 | 0.3398 |
| AL008170 | LUP | Positivo | Positivo | 0.024 | 0.976 | 0.0132 | 0.5931 | 0.0541 | 0.3396 |

| | | | | | | | | | |
|----------|-----|----------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| AL010988 | LUP | Positivo | Negativo | 0.0243 | 0.9757 | 0.0130 | 0.5925 | 0.0541 | 0.3404 |
| AVA00010 | SEM | Positivo | Positivo | 0.0191 | 0.9809 | 0.0116 | 0.3466 | 0.0278 | 0.6140 |
| AVA00012 | SEM | Positivo | Positivo | 0.019 | 0.981 | 0.0113 | 0.3465 | 0.0277 | 0.6145 |
| AVA00017 | SEM | Positivo | Positivo | 0.0191 | 0.9809 | 0.0114 | 0.3480 | 0.0268 | 0.6138 |
| AVA00025 | SEM | Positivo | Positivo | 0.2622 | 0.7378 | 0.1590 | 0.2380 | 0.1904 | 0.4126 |
| AVA00027 | SEM | Negativo | Positivo | 0.4197 | 0.5803 | 0.1362 | 0.1884 | 0.4908 | 0.1846 |
| AVA00040 | SEM | Positivo | Negativo | 0.0193 | 0.9807 | 0.0114 | 0.3470 | 0.0282 | 0.6134 |
| AVA00084 | SEM | Positivo | Positivo | 0.0429 | 0.9571 | 0.0222 | 0.3360 | 0.0468 | 0.5950 |
| AVA00086 | SEM | Positivo | Positivo | 0.0427 | 0.9573 | 0.0223 | 0.3369 | 0.0482 | 0.5926 |
| AVA00098 | SEM | Positivo | Positivo | 0.0269 | 0.9731 | 0.0150 | 0.3339 | 0.0572 | 0.5939 |
| AVA00152 | SEM | Positivo | Positivo | 0.019 | 0.981 | 0.0112 | 0.3462 | 0.0271 | 0.6155 |
| AVA00162 | SEM | Positivo | Positivo | 0.0194 | 0.9806 | 0.0114 | 0.3463 | 0.0278 | 0.6145 |
| AVA00173 | SEM | Positivo | Positivo | 0.0191 | 0.9809 | 0.0114 | 0.3471 | 0.0278 | 0.6137 |
| AVA00177 | SEM | Positivo | Positivo | 0.0431 | 0.9569 | 0.0220 | 0.3378 | 0.0474 | 0.5928 |
| AVA00264 | SEM | Positivo | Positivo | 0.0281 | 0.9719 | 0.0150 | 0.3302 | 0.0738 | 0.5810 |
| AVA00319 | SEM | Negativo | Positivo | 0.0434 | 0.9566 | 0.0219 | 0.3249 | 0.0751 | 0.5781 |
| AVA00323 | SEM | Positivo | Positivo | 0.0194 | 0.9806 | 0.0112 | 0.3478 | 0.0274 | 0.6136 |
| AVA00327 | SEM | Positivo | Positivo | 0.019 | 0.981 | 0.0114 | 0.3481 | 0.0282 | 0.6123 |
| AVA00400 | SEM | Positivo | Negativo | 0.0432 | 0.9568 | 0.0222 | 0.3374 | 0.0481 | 0.5923 |
| AVA00449 | SEM | Positivo | Positivo | 0.0191 | 0.9809 | 0.0112 | 0.3471 | 0.0276 | 0.6141 |
| AVA00455 | SEM | Positivo | Positivo | 0.0435 | 0.9565 | 0.0221 | 0.3373 | 0.0470 | 0.5936 |
| AVA00466 | SEM | Positivo | Positivo | 0.0267 | 0.9733 | 0.0150 | 0.3358 | 0.0578 | 0.5914 |
| AVA00523 | SEM | Positivo | Positivo | 0.0193 | 0.9807 | 0.0114 | 0.3466 | 0.0278 | 0.6142 |
| AVA00575 | SEM | Positivo | Positivo | 0.0281 | 0.9719 | 0.0150 | 0.3297 | 0.0732 | 0.5821 |
| AVA00580 | SEM | Negativo | Positivo | 0.4838 | 0.5162 | 0.1649 | 0.1538 | 0.4246 | 0.2567 |
| AVA00595 | SEM | Positivo | Positivo | 0.0418 | 0.9582 | 0.0183 | 0.5419 | 0.1315 | 0.3083 |
| AVA00598 | SEM | Negativo | Positivo | 0.4364 | 0.5636 | 0.1160 | 0.1614 | 0.5653 | 0.1573 |
| AVA00642 | SEM | Positivo | Positivo | 0.0193 | 0.9807 | 0.0112 | 0.3470 | 0.0267 | 0.6151 |
| AVA00686 | SEM | Positivo | Positivo | 0.0194 | 0.9806 | 0.0113 | 0.3472 | 0.0272 | 0.6143 |

| | | | | | | | | | |
|----------|-----|----------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| AVA00765 | SEM | Negativo | Positivo | 0.0479 | 0.9521 | 0.0221 | 0.3215 | 0.0847 | 0.5717 |
| AVA00778 | SEM | Positivo | Positivo | 0.0263 | 0.9737 | 0.0150 | 0.3351 | 0.0560 | 0.5939 |
| AVA01000 | SEM | Negativo | Positivo | 0.0263 | 0.9737 | 0.0149 | 0.3438 | 0.0368 | 0.6045 |
| AVA01516 | SEM | Positivo | Positivo | 0.0191 | 0.9809 | 0.0114 | 0.3480 | 0.0274 | 0.6132 |

ANEXO 16

Determinación de haplogrupos en el genotipo *Pfhrp2* y *Pfhrp3* con cinco marcadores microsatélites de *P.falciparum*.

| Fecha | Cód.muestra | Haplotipo | Haplogrupo | Pop | PCR | | Análisis total K=4 | | | |
|----------|-------------|--------------------|------------|-----|---------------|---------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|
| | | | | | <i>Pfhrp2</i> | <i>Pfhrp3</i> | Cluster 1 | Cluster 2 | Cluster 3 | Cluster 4 |
| 12/11/12 | AC002654 | 65 180 94 154 162 | haplo-1 | CAH | Negativo | Negativo | 0.89 | 0.02 | 0.07 | 0.02 |
| 9/12/13 | AL013360 | 65 180 94 154 162 | haplo-1 | LUP | Negativo | Negativo | 0.89 | 0.02 | 0.07 | 0.02 |
| 3/3/14 | AL016314 | 65 180 94 154 162 | haplo-1 | LUP | Negativo | Negativo | 0.89 | 0.02 | 0.07 | 0.02 |
| 27/3/14 | AL018388 | 65 180 94 154 162 | haplo-1 | LUP | Negativo | Negativo | 0.89 | 0.02 | 0.07 | 0.02 |
| 4/6/14 | AL015482 | 65 180 94 154 162 | haplo-1 | LUP | Positivo | Negativo | 0.89 | 0.02 | 0.07 | 0.02 |
| 1/3/13 | AVA00013 | 65 180 98 154 162 | haplo-2 | SEM | Negativo | Negativo | 0.96 | 0.01 | 0.02 | 0.01 |
| 1/3/13 | AVA00062 | 65 180 98 154 162 | haplo-2 | SEM | Negativo | Negativo | 0.96 | 0.01 | 0.02 | 0.01 |
| 2/3/13 | AVA00145 | 65 180 98 154 162 | haplo-2 | SEM | Negativo | Negativo | 0.96 | 0.01 | 0.02 | 0.01 |
| 2/3/13 | AVA00146 | 65 180 98 154 162 | haplo-2 | SEM | Positivo | Positivo | 0.96 | 0.01 | 0.02 | 0.01 |
| 10/3/13 | AVA00161 | 65 180 98 154 162 | haplo-2 | SEM | Negativo | Negativo | 0.96 | 0.01 | 0.02 | 0.01 |
| 10/3/13 | AVA00172 | 65 180 98 154 162 | haplo-2 | SEM | Positivo | Positivo | 0.96 | 0.01 | 0.02 | 0.01 |
| 10/3/13 | AVA00232 | 65 180 98 154 162 | haplo-2 | SEM | Negativo | Negativo | 0.96 | 0.01 | 0.02 | 0.01 |
| 10/3/13 | AVA00280 | 65 180 98 154 162 | haplo-2 | SEM | Negativo | Negativo | 0.96 | 0.01 | 0.02 | 0.01 |
| 21/3/13 | AVA00381 | 65 180 98 154 162 | haplo-2 | SEM | Negativo | Negativo | 0.96 | 0.01 | 0.02 | 0.01 |
| 31/3/13 | AVA00484 | 65 180 98 154 162 | haplo-2 | SEM | Positivo | Negativo | 0.96 | 0.01 | 0.02 | 0.01 |
| 31/3/13 | AVA00573 | 65 180 98 154 162 | haplo-2 | SEM | Negativo | Negativo | 0.96 | 0.01 | 0.02 | 0.01 |
| 31/3/13 | AVA00604 | 65 180 98 154 162 | haplo-2 | SEM | Negativo | Positivo | 0.96 | 0.01 | 0.02 | 0.01 |
| 1/3/13 | AVA00010 | 65 186 112 151 157 | haplo-3 | SEM | Positivo | Positivo | 0.01 | 0.35 | 0.03 | 0.61 |
| 1/3/13 | AVA00012 | 65 186 112 151 157 | haplo-3 | SEM | Positivo | Positivo | 0.01 | 0.35 | 0.03 | 0.61 |
| 1/3/13 | AVA00017 | 65 186 112 151 157 | haplo-3 | SEM | Positivo | Positivo | 0.01 | 0.35 | 0.03 | 0.61 |
| 1/3/13 | AVA00040 | 65 186 112 151 157 | haplo-3 | SEM | Positivo | Negativo | 0.01 | 0.35 | 0.03 | 0.61 |
| 1/3/13 | AVA00152 | 65 186 112 151 157 | haplo-3 | SEM | Positivo | Positivo | 0.01 | 0.35 | 0.03 | 0.62 |
| 10/3/13 | AVA00162 | 65 186 112 151 157 | haplo-3 | SEM | Positivo | Positivo | 0.01 | 0.35 | 0.03 | 0.61 |
| 10/3/13 | AVA00173 | 65 186 112 151 157 | haplo-3 | SEM | Positivo | Positivo | 0.01 | 0.35 | 0.03 | 0.61 |

| | | | | | | | | | | |
|----------|----------|--------------------|---------|-----|----------|----------|------|------|------|------|
| 21/3/13 | AVA00323 | 65 186 112 151 157 | haplo-3 | SEM | Positivo | Positivo | 0.01 | 0.35 | 0.03 | 0.61 |
| 21/3/13 | AVA00327 | 65 186 112 151 157 | haplo-3 | SEM | Positivo | Positivo | 0.01 | 0.35 | 0.03 | 0.61 |
| 21/3/13 | AVA00449 | 65 186 112 151 157 | haplo-3 | SEM | Positivo | Positivo | 0.01 | 0.35 | 0.03 | 0.61 |
| 31/3/13 | AVA00523 | 65 186 112 151 157 | haplo-3 | SEM | Positivo | Positivo | 0.01 | 0.35 | 0.03 | 0.61 |
| 5/5/13 | AVA00642 | 65 186 112 151 157 | haplo-3 | SEM | Positivo | Positivo | 0.01 | 0.35 | 0.03 | 0.62 |
| 5/5/13 | AVA00686 | 65 186 112 151 157 | haplo-3 | SEM | Positivo | Positivo | 0.01 | 0.35 | 0.03 | 0.61 |
| 22/9/13 | AVA01516 | 65 186 112 151 157 | haplo-3 | SEM | Positivo | Positivo | 0.01 | 0.35 | 0.03 | 0.61 |
| 12/12/12 | AC002748 | 65 186 94 151 157 | haplo-5 | CAH | Positivo | Positivo | 0.01 | 0.60 | 0.05 | 0.34 |
| 7/3/13 | AC005334 | 65 186 94 151 157 | haplo-5 | CAH | Positivo | Positivo | 0.01 | 0.59 | 0.05 | 0.34 |
| 7/3/13 | AC005337 | 65 186 94 151 157 | haplo-5 | CAH | Positivo | Positivo | 0.01 | 0.59 | 0.05 | 0.34 |
| 7/3/13 | AC005339 | 65 186 94 151 157 | haplo-5 | CAH | Positivo | Positivo | 0.01 | 0.59 | 0.05 | 0.34 |
| 8/3/13 | AC005411 | 65 186 94 151 157 | haplo-5 | CAH | Positivo | Positivo | 0.01 | 0.59 | 0.06 | 0.34 |
| 8/3/13 | AC005412 | 65 186 94 151 157 | haplo-5 | CAH | Positivo | Positivo | 0.01 | 0.59 | 0.05 | 0.34 |
| 11/3/13 | AC005700 | 65 186 94 151 157 | haplo-5 | CAH | Positivo | Positivo | 0.01 | 0.59 | 0.05 | 0.34 |
| 11/3/13 | AC005725 | 65 186 94 151 157 | haplo-5 | CAH | Positivo | Positivo | 0.01 | 0.59 | 0.05 | 0.34 |
| 12/3/13 | AC005751 | 65 186 94 151 157 | haplo-5 | CAH | Positivo | Positivo | 0.01 | 0.59 | 0.05 | 0.34 |
| 10/9/12 | AL000661 | 65 186 94 151 157 | haplo-5 | LUP | Positivo | Positivo | 0.01 | 0.59 | 0.05 | 0.34 |
| 3/10/12 | AL000919 | 65 186 94 151 157 | haplo-5 | LUP | Positivo | Positivo | 0.01 | 0.59 | 0.05 | 0.34 |
| 3/10/12 | AL004452 | 65 186 94 151 157 | haplo-5 | LUP | Positivo | Positivo | 0.01 | 0.59 | 0.05 | 0.34 |
| 10/6/13 | AL007860 | 65 186 94 151 157 | haplo-5 | LUP | Positivo | Positivo | 0.01 | 0.59 | 0.05 | 0.34 |
| 17/6/13 | AL008140 | 65 186 94 151 157 | haplo-5 | LUP | Positivo | Positivo | 0.01 | 0.59 | 0.05 | 0.34 |
| 18/6/13 | AL008170 | 65 186 94 151 157 | haplo-5 | LUP | Positivo | Positivo | 0.01 | 0.59 | 0.05 | 0.34 |
| 27/9/13 | AL010988 | 65 186 94 151 157 | haplo-5 | LUP | Positivo | Negativo | 0.01 | 0.59 | 0.05 | 0.34 |