



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

**ESTRATEGIAS DE CONTROL
BASADO EN LA DETECCIÓN DE
INFECCIONES POR PCR EN TIEMPO
REAL Y SU EFECTO EN LA
DIVERSIDAD GENÉTICA Y LA
REPRODUCCIÓN DE *Plasmodium vivax*
EN LAS CUENCAS MAZAN Y NAPO**

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

ROBERSON RAMIREZ SAAVEDRA

LIMA – PERÚ
2020

ASESOR:

Dra. DIONICIA BAZILIZA GAMBOA VILELA

CO-ASESOR:

Msc. PAULO MANRIQUE VALVERDE

JURADO DE TESIS

DR. JORGE ENRIQUE RODRIGUEZ BAILON

PRESIDENTE

DRA. ANA CECILIA COLAROSI SALINAS

VOCAL

MG. TERESA VICTORIA BARRETO GAVIRIA

SECRETARIA

DEDICATORIA

A mi querida esposa Margarita Rivera Pinedo, por su incondicional amor y comprensión para salir adelante juntos, a mis hijos Cristopher y Emili, los pilares que me motivan a continuar superándome. A mis padres Dolores Saavedra de Ramirez y Americo Ramirez Cobos, por sus consejos y guía, y por último a mis hermanas Veronica e Ivonne Ramirez Saavedra.

AGRADECIMIENTO

A mi asesora Dra. Dionicia Gamboa Vilela y co-asesor Mg. Paulo Manrique Valverde, por sus tiempo, dedicación y paciencia en todo mi aprendizaje, para mi formación y la realización de la tesis.

A todos los miembros del Laboratorio de Malaria de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por sus consejo y facilidades para realizar la tesis, y porque me hicieron sentir como mi segunda familia y mi segundo hogar.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

- Este trabajo fue financiado principalmente por el proyecto “Translational Research Development for Endemic Infectious Diseases of Amazonia”- FOGARTY, número del proyecto: 2D43TW007120-11A1.
- Este trabajo también fue financiado por el Proyecto “Dinámica de Transmisión de Malaria Residual y Re-Emergente en la Amazonia: Definiendo las Rutas Hacia la Eliminación de La Malaria”- Proyecto 1 (Epidemiología), del Centro de Excelencia Internacional de Investigación en Malaria (Amazonia-ICEMR 2.0) (SIDISI:101518), número del proyecto: 2 U19 AI089681-08
- Las muestras fueron colectas del proyecto Costo-efectividad de estrategias optimizadas de detección y tratamiento de infecciones asintomáticas por malaria en la Amazonia Peruana. (SIDISI: 0000066235), proyecto financiado por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT - 008-2014).

TABLA DE CONTENIDO

LISTADO DE FIGURAS	
LISTADO DE TABLAS.....	
RESUMEN	
ABSTRACT.....	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	4
2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
III. MARCO TEORICO.....	6
3.1 ESTADO ACTUAL DE LA MALARIA EN EL PERU.	6
3.2 ESTRATEGIAS DE CONTROL DE LA MALARIA	8
3.3 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS Y TRANSMISION DE <i>Plasmodium spp.</i>	13
3.3.1 CICLO BIOLOGICO DE <i>Plasmodium spp.</i>	13
3.3.2 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE <i>Plasmodium vivax</i>	15
3.4 CONCEPTOS DE GENÉTICA POBLACIONAL.....	19
3.5 DIVERSIDAD GENETICA DE <i>Plasmodium vivax</i>	28
3.6 REPRODUCCIÓN DE <i>Plasmodium spp.</i>	30
IV. JUSTIFICACIÓN	33
V. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	35
VI. METODOLOGÍA	37
VII. RESULTADOS	55
VIII. DISCUSIÓN	73
IX. CONCLUSIONES	80
X. LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	82
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1: Diseño de Investigación y estrategias de control implementadas. (Pág. 37)

Figura 2: Ubicación geográfica de las comunidades muestreadas en el estudio. (Pág. 39)

Figura 3: Flujograma de selección de muestras. (Pág. 43)

Figura 4: Diferenciación genética entre estrategias. (Pág. 55)

Figura 5: Diferenciación genética entre estrategias en el tiempo. (Pág. 56)

Figura 6: Efecto de la estrategia 1 en las métricas de diversidad genética en el tiempo. (Pág. 58)

Figura 7: Efecto de la estrategia 2 en las métricas de diversidad genética en el tiempo. (Pág. 59)

Figura 8: Efecto de la estrategia 3 en las métricas de diversidad genética en el tiempo. (Pág. 59)

Figura 9: Red mínima de expansión haplotípica Estrategia 1: Mes0. (Pág. 61)

Figura 10: Red mínima de expansión haplotípica Estrategia 2: Mes0. (Pág. 61)

Figura 11: Red mínima de expansión haplotípica Estrategia 3: Mes0. (Pág. 62)

Figura 12: Red mínima de expansión haplotípica Estrategia 2: Mes12-Mes18. (Pág. 62)

Figura 13: Red mínima de expansión haplotípica Estrategia 3: Mes12-Mes18. (Pág. 63)

Figura 14: Red mínima de expansión haplotípica Estrategia 1: Mes12-Mes18.

(Pág. 63)

Figura 15: Efecto de las tres estrategias en las métricas de diversidad genética en la cuenca Mazan. (Pág. 65)

Figura 16: Red mínima de expansión haplotípica de *P. vivax* en la cuenca Mazan.

(Pág. 65)

Figura 17: Efecto de las tres estrategias en las métricas de diversidad genética en la cuenca Napo. (Pág. 66)

Figura 18: Red mínima de expansión de haplotipos de *P. viva* en la cuenca Napo.

(Pág. 66)

Figura 19: Red mínima de expansión de haplotipos de *P. viva* en la comunidad de Libertad. (Pág. 68)

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1: Tamaño de muestra utilizada en este estudio. (Pág. 54).

Tabla 2: Muestras amplificadas por cada marcador y por cada estrategia. (Pág. 110)

RESUMEN

Este trabajo tuvo como objetivo general evaluar el efecto de estrategias de control en las métricas de diversidad genética y la reproducción de *Plasmodium vivax* en las cuencas del Mazán y Napo. Se genotipificaron 92 muestras con al menos 75% con perfil completo (mayor a 10 locis) con 16 marcadores microsatélites. Al inicio de la implementación de las tres estrategias (Mes 0) se encontró, una moderada a alta diferenciación poblacional, con bajo flujo genético ($F_{st} > 1.3$). Durante la implementación de las tres estrategias, solo la estrategia 1 produjo una disminución significativa ($p\text{-valor} < 0.05$) de haplotipos genéticamente relacionados. No se observaron cambios significativos ($p\text{-valor} > 0.05$) en las métricas genético poblaciones a través del tiempo. Análisis complementarios, mostraron que en Libertad (donde se implementó la estrategia 3) se encontraron infecciones recurrentes y una reducción de casi dos veces más de haplotipos relacionados con respecto al año 2015. No se encontró un efecto reciente cuello de botella en la población parasitaria por cada estrategia. En conclusión, las tres estrategias de control no mostraron cambios en las métricas genético poblaciones, evidenciando la vulnerabilidad al ingreso de haplotipos genéticamente no relacionados.

Palabras claves: Estrategias de control, *P. vivax*, Microsatélites, métricas genético poblacional, cuello de botella.

ABSTRACT

This work had as a general objective to evaluate the effect of control strategies on genetic diversity metrics and the reproduction of *Plasmodium vivax* in the Mazán and Napo basins. 92 samples were genotyped with at least 75% complete profile (greater than 10 loci) with 16 microsatellite markers. At the beginning of the implementation of the three strategies (Month 0) it was found, one moderate to high population differentiation, with low genetic flow ($F_{st} > 1.3$). During the implementation of the three strategies, only strategy 1 produced a significant decrease (p-value < 0.05) of genetically related haplotypes. No significant changes (p-value > 0.05) were observed in the genetic population metrics over time. Complementary analyzes showed that in Libertad (where strategy 3 was implemented) recurrent infections and a reduction of almost twice as many haplotypes were found compared to 2015. A recent bottleneck effect was not found in the parasitic population due to each strategy. In conclusion, the three control strategies showed no changes in the genetically metric populations, evidencing the vulnerability to the entry of genetically unrelated haplotypes.

Keywords: Control strategies, *P. vivax*, microsatellites, population genetic metrics, bottlenecks.

I. INTRODUCCIÓN

La malaria es una amenaza que aún asecha a los países tropicales y subtropicales del mundo. Según el informe anual de la Organización mundial de la salud (OMS), en el 2018 se han producido 219 millones de casos de malaria en todo el mundo (1). El 92% de estos casos se producen en el continente Africano, el 7% en Asia y el Mediterráneo, y el 1% en América. Fuera del continente africano, el 74% de las infecciones son producidas por *Plasmodium vivax*, trayendo como consecuencia una alta morbilidad dentro de los países endémicos de estos continentes (1).

En el Perú anualmente se producen entre 45 a 60 mil casos de malaria (2). La amazonia Peruana reporta más del 90% de estos casos, y el 81.43% de estos son causados por *Plasmodium vivax* (2). Para controlar y eliminar la malaria en la región Loreto, el Ministerio de Salud del Perú (MINSA) emplea estrategias basadas en la detección pasiva de casos (DPC) de manera rutinaria, y la detección activa de casos (DAC) de forma eventual (3,4), cuando hay un Índice Parasitario Anual (IPA) mayor al 5% y más del 20% de la población presenta síntomas febriles (5). En ambos casos utiliza la microscopía como principal herramienta de diagnóstico; sin embargo esta presenta muchas limitaciones (6–8).

Ante la necesidad de implementar nuevas estrategias de control con herramientas de diagnóstico altamente sensibles, el proyecto Círculos “Hacia la Eliminación de la Malaria en el Perú”, financiado por Concytec (008-2014), implementó tres estrategias de control basadas en la detección

activa de casos y tratamiento en baja transmisión mediante diagnóstico por microscopia y/o PCR (reacción en cadena de la polimerasa, PCR por sus siglas en Inglés) (9). El área de estudio involucró 15 comunidades ubicadas en las cuencas de los ríos Mazan y Napo del distrito de Mazan, distrito considerado de alta transmisión, con más de dos mil y ocho mil casos en los años 2016 y 2017 respectivamente, años en los cuales se realizó este estudio (9).

Sin embargo, hasta la fecha se desconoce el efecto de estas estrategias de control sobre la diversidad genética y la reproducción de *P. vivax*; más aún en escenarios que presentan transmisión asociada a una alta movilización humana, como es el caso de las cuencas Mazan y Napo, donde se implementaron estas estrategias.

Para determinar si la estrategia basada en la detección activa de casos por PCR en baja transmisión tuvo un mayor efecto en la disminución de la diversidad parasitaria y la expansión de haplotipos relacionados a comparación de las estrategias basadas en microscopia; se realizó la medición de la heterocigocidad esperada (H_e), alelos efectivos, tasa mutacional poblacional (θ), desequilibrio de ligamiento, infecciones policlonales y el exceso de heterocigotos de las infecciones detectadas en estas tres estrategias. Adicionalmente, se evaluaron las relaciones genéticas mediante una red de expansión haplotípica al inicio y durante la implementación de estas estrategias de control.

Los resultados obtenidos resaltan la importancia de la importación de parásitos y los relapsos en el mantenimiento de la diversidad genética de la población parasitaria, pese a la reducción de la propagación clonal de los haplotipos observados en el estudio. Por esto, es necesario controlar la vulnerabilidad de las áreas endémicas a la importación de nuevos parásitos para evitar la resurgencia de la malaria y así hacer sostenible los logros alcanzados por las estrategias de control.

II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Históricamente en el Perú, la malaria ha seguido un comportamiento fluctuante (10), en donde la falta de sostenibilidad de las estrategias, así como la poca comprensión del efecto de las mismas sobre la población parasitaria ha permitido la persistencia y el resurgimiento continuo de la malaria en este país. Debido a esto, no solo es importante implementar y darles sostenibilidad económica a los planes de control de la malaria en el Perú, sino también realizar un monitoreo continuo y adecuado que permita determinar los factores que contribuyen con la persistencia de casos.

Una forma de monitoreo es el seguimiento de los casos mediante la estimación de la Prevalencia o Incidencia (11,12). Sin embargo, la información otorgada por estas métricas no permite identificar de manera directa las fuentes de infección y su contribución. Por otro lado, se espera que las estrategias de control tengan un efecto sobre la diversidad y reproducción de la población parasitaria debido al cuello de botella generado. De esta manera, los cambios en la diversidad genética podrían ser utilizados para medir y monitorear el efecto de las estrategias de control. Es así que una reducción de diversidad genética sería un indicio claro de un efecto positivo de la estrategia (13); mientras que la no reducción o el incremento de la diversidad genética implicaría el fracaso de la misma. Además, la reproducción del parásito es clonal (14), y esta es fomentada por personas con hábitos similares y mosquitos con patrones de

conducta parecidas, que comparten un mismo nicho ecológico. Esto tiende a generar la aparición de subpoblaciones de parásitos estrechamente relacionados entre sí, lo cual podría ser utilizado para determinar los factores que favorecen la transmisión (15). Por tal motivo, las métricas genético poblacionales complementarían la información epidemiológica clásica.

No obstante, hasta la fecha no se conoce cuál es el comportamiento de las métricas genético poblacionales durante y después de la implementación de estrategias de control en el Perú. El Proyecto Círculos: “Hacia la Eliminación de la Malaria en el Perú” brinda la oportunidad para poder medir el efecto sobre la diversidad parasitaria y la reproducción de los mismos durante la implementación de tres estrategias de control basadas en la detección activa y pasiva de casos en épocas de baja transmisión y el uso de la microscopía y/o PCR como herramientas de diagnóstico.

Esta información será relevante para una mejor comprensión de la persistencia de los casos, y de los factores involucrados en los cambios de la diversidad genética en las poblaciones de *Plasmodium vivax* circulantes en ambas cuencas del estudio.

III. MARCO TEORICO

3.1 ESTADO ACTUAL DE LA MALARIA EN EL PERU.

Según la OMS, en el 2018 cerca de 91 países reportaron un total de 219 millones de casos de malaria (1). Del mismo modo, en América Latina, se reportó un incremento proporcional de esta enfermedad desde el 2016 y sobre todo en Venezuela (16). En el Perú desde el 2012 se ha producido un aumento gradual de los casos de malaria y en el 2018 se produjeron más de 45 mil casos, de estos el 95% se concentraron en la región Loreto (17). Asimismo, hasta Octubre del 2019, fueron 89 distritos en todo el Perú que registraron al menos un caso de malaria, el 97.7% de estos distritos están concentrados en los departamentos de Loreto y Amazonas. De ellos, Loreto reportó más de 16 mil casos, con una tasa de incidencia acumulada de 15.66 casos por 1000 habitantes. El 81.43% de estos casos fueron producidos por *P. vivax* y el 18.56% por *P. falciparum*, estas dos especies se encuentran en un ratio de 5 a 1 (*P. vivax/P. falciparum*) (17). En consecuencia, pese a que disminuyeron aproximadamente 21 mil casos en comparación a Octubre del 2018, la malaria aún continúa siendo un desafío para las autoridades nacionales y regionales de salud.

La región de Loreto es considerada como una zona hipo-endémica y de transmisión perenne, con incremento de casos de manera estacional y con brotes epidémicos (29), esto debido a la baja tasa de incidencia acumulada (0.73 casos por 100mil/hab) (10) y al aumento de casos entre los meses de Febrero y Julio, épocas donde se incrementan las

lluvias en la Amazonia Peruana (10,17,19). El MINSA es el ente encargado de registrar las infecciones de malaria que son detectadas por gota gruesa y microscopia (“estándar de oro” para los métodos de diagnóstico). Estudios longitudinales efectuados en comunidades alrededor de Iquitos reportaron una prevalencia de 2 - 3.2% y de 5.2 - 21.1%, utilizando microscopia y PCR respectivamente (6,20). Esto evidencia una sub estimación de los casos cuando se usa microscopia y sumado a esto, la baja sensibilidad de detección (12.9% - 24.3%) cuando se usa el PCR como método de referencia (6,8), y por consiguiente se debe volver a reconsiderar la clasificación de endemidad de malaria sobre todo en la región Loreto.

La transmisión de malaria en la región Loreto es heterogénea a nivel microgeográfico, porque muestra variación en el espacio y tiempo (21). Esta característica se debe a la presencia de diferentes agrupaciones o focos de transmisión que varían dentro de cada comunidad y entre comunidades o distritos (22,23). Un foco de transmisión se define como un espacio de varios kilómetros cuadrados que mantienen la transmisión de malaria, y dentro de estos focos existen unidades pequeñas denominados puntos calientes (“Hotspots”) (22). Los puntos calientes pueden ser un grupo de casas, un espacio menor a 1Km que experimentan altos niveles de exposición a mosquitos infecciosos y por tanto una alta incidencia de casos (22,24).

La presencia de los focos de transmisión en la Amazonia Peruana puede deberse a varios factores. Entre estos factores tenemos la presencia de individuos infectados con malaria pero que son asintomáticos, los puntos calientes, los múltiples criaderos del mosquito *Anopheles darlingi*, etc. Otros factores también pueden ser el aumento excesivo de lluvias, características físicas de las viviendas, el comportamiento humano (movimiento humano relacionado a la ocupación) y la variación a la exposición a mosquitos infectados que mantienen los focos de transmisión, así como también la interconexión de estos entre o dentro de las comunidades (6,25,26).

3.2 ESTRATEGIAS DE CONTROL DE LA MALARIA

Una estrategia, según el diccionario de la lengua española, es un conjunto de reglas que aseguran una decisión óptima en cada momento, es decir un esquema estandarizado para lograr un objetivo trazado en el tiempo (27). Este concepto es aplicado por la OMS para la lucha contra la malaria, debido a que incorporó una serie de estrategias focalizadas en varios aspectos de esta enfermedad en los diferentes continentes del mundo.

Desde 1950 hasta la actualidad, la OMS comenzó a implementar nuevas estrategias que permitan reducir la mayor cantidad de infecciones de malaria, considerando al control de la malaria a corto plazo para pasar a la fase de eliminación a largo plazo (28). Entre las

estrategias podemos mencionar la vigilancia epidemiológica y el control vectorial.

La Vigilancia epidemiológica es una herramienta de monitoreo de casos de malaria. Esta vigilancia puede combinar dos métodos de detección: la primera es la detección pasiva de casos (DPC) y la segunda es la detección activa de casos (DAC). Según la OMS, la detección pasiva de casos, se refiere a los casos de personas que fueron por su propia iniciativa a un establecimiento de salud/Hospital o se aproximaron a un trabajador de salud de la comunidad (agente comunitario de salud) para obtener tratamiento, usualmente por enfermedad febril (29). Este tipo de estrategia es el primer enfoque que utiliza el MINSA en el Perú para controlar las infecciones de *Plasmodium spp* de manera cotidiana, así como también brindar tratamiento gratuito a los pacientes positivos.

La DPC se realiza en los establecimientos de salud y usa la microscopia como herramienta de diagnóstico (30). Esta estrategia se caracteriza porque solo trata a las infecciones del tipo sintomáticas, que son frecuente en época de alta transmisión; sin embargo, no trata las infecciones asintomáticos, debido a que la mayoría de asintomáticos presentan bajas densidades parasitarias que la microscopia no puede detectar, además que estas personas no asisten al establecimiento de salud por no sentirse enfermas (7,8). Por lo tanto, esta estrategia no permite interrumpir de manera efectiva la

transmisión, porque no detecta ni trata oportunamente este tipo de infecciones.

La segunda estrategia utilizada por el MINSA es la DAC, definida por la OMS, como los casos encontrados por los trabajadores de la salud a nivel comunitario y vivienda entre los grupos de población que se consideran de alto riesgo (29). La detección activa de casos se puede realizar con la detección de fiebre seguida de un examen parasitológico (gota gruesa y a veces mediante una prueba de diagnóstico rápido) de todos los pacientes febriles, o como un examen parasitológico de toda una población de riesgo sin examen previo de fiebre (30).

Dentro de la DAC se encuentra la detección reactiva de casos (DRC), que es la identificación de infecciones secundarias o colaterales a partir de un caso índice. Sin embargo, esta estrategia se utiliza cuando la población presenta un índice parasitario anual (IPA) mayor al 5% y casos febriles. Bajo estas circunstancias, el personal de salud y agentes comunitarios de salud se movilizan inmediatamente para buscar a los febriles en sus viviendas, se toma una muestra de gota gruesa a toda la familia a partir de un caso índice y solo reciben tratamiento aquellos que salen positivos por microscopía (30). La DAC sólo se utiliza en algunas comunidades donde se presenta un brote de casos.

La DAC es más efectiva en detectar casos en comparación de la DPC. Debido a que la DAC presenta mayor cobertura y permite la detección y tratamiento temprano de los casos sintomáticos y asintomáticos

microscópicos (31). Por ejemplo, un estudio comparó la DAC y la DPC, mostrando que casi el 60% de las infecciones confirmadas, fueron reportados por DAC en comparación con la DPC (32); del mismo modo en la India, se determinó una diferencia significativa en el ratio de detección de casos positivos (1408/3601) con DAC comparado con DPC (139/2743) (33) y en la Amazonia Peruana se evidenció un incremento en la prevalencia de 4 veces más en *P. falciparum* y cerca de 2 veces más de *P. vivax*, esto debido a la implementación de la DAC (34).

Entre las herramientas moleculares que existen, la PCR es la técnica más usada en investigación. Esta técnica permite amplificar moléculas de Acido Desoxirribonucleico (ADN) a través de la ADN polimerasa a partir de pequeñas cantidades de ADN obtenido de una muestra biológica (35). Asimismo, es utilizado en el diagnóstico de la malaria, debido a que presenta una alta sensibilidad (90.9%) y especificidad (94.6%) en la detección de infecciones asintomáticas submicroscópicas sumado a esto permite detectar aproximadamente 0.01 p/ul de muestra (36–38). Debido a esto, la PCR puede reemplazar a la microscopia utilizada por el MINSA; sin embargo, su costo aun es alto, requiere equipos sofisticados y personal altamente entrenado.

Se necesita buscar otras técnicas moleculares costo-efectivas para la detección de infecciones asintomáticas. Una de esas técnicas puede ser LAMP (Amplificación Isotérmica de ADN mediada por horquilla,

LAMP por sus siglas en inglés). Esta técnica se basa en la utilización de 06 pares de cebadores diferentes y liofilizados que amplifican una zona blanca (“target”) del ADN a una sola temperatura y los resultados son observados por fluorescencia o turbidez. Este método es sencillo, no se requiere de mucha infraestructura ni de equipos caros (39). Asimismo, es ideal para ser usado en las comunidades alejadas como el distrito de Mazán, tal como se evidencia en el trabajo de Serra-Casas *et al.*, (40) que reportaron una sensibilidad y especificidad de 91.8% y 91.9% respectivamente, en comparación con el PCR en tiempo real, el cual presenta una especificidad de 100% y sensibilidad del 94.1% en la detección de infecciones (41).

Otra estrategia que se focaliza en el mosquito es el control vectorial. Las principales estrategias de control vectorial están basadas en controlar la densidad del mosquito, como por ejemplo la fumigación con insecticidas dentro y/o fuera de las casas, dependiendo del comportamiento de los mosquitos, los cuales pueden ser endofílicos o exofílicos (42,43). Otra manera de interrumpir la transmisión, es el uso de mosquiteros impregnados con insecticidas de larga duración para mosquitos con hábitos alimenticios nocturnos (42). Sin embargo, estas estrategias fallan en su implementación debido a que existen varios reportes recientes que han evidenciado la alta plasticidad del mosquito y el cambio de su comportamiento. Esto debido a muchos factores, como por ejemplo la deforestación, la presencia de criaderos naturales o artificiales como las piscigranjas, construcción de nuevas carreteras,

etc.; lo que propicia su reproducción y propagación en las comunidades (44).

Se espera que todas las estrategias implementadas por el MINSA interrumpan la transmisión a corto plazo. Es importante también tener en cuenta que estas estrategias se adecuen al contexto epidemiológico y micro-epidemiológico dentro de las comunidades, sumado a esto su efecto en la receptividad y la vulnerabilidad de las zonas. La receptividad según la OMS, es la capacidad que tiene una zona para transmitir malaria, así como los factores epidemiológicos y geográficos. La vulnerabilidad, es el ratio de importación de casos de malaria a una zona donde la malaria este contralada (29).

3.3 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS Y TRANSMISION DE *Plasmodium spp.*

3.3.1 CICLO BIOLOGICO DE *Plasmodium spp.*

La malaria es causada por un protozoario llamado *Plasmodium spp.*; pero es transmitido por la picadura de un mosquito hembra. La malaria durante su desarrollo tiene un ciclo biológico sexual que se inicia el mosquito del genero *Anopheles spp.*, y otro ciclo asexual que se desarrolla en el hospedero humano (45). El ciclo sexual se inicia cuando el mosquito ingiere sangre de un individuo infectado con malaria. Dentro de la sangre se encuentran los gametocitos que ingresan al estómago del mosquito. Seguidamente en el estómago del mosquito se liberan los gametocitos y se forma el microgameto (masculino) y el macrogameto (femenino), luego los microgametocitos

sufren una exflagelación (46) y comienzan a moverse hacia el macrogameto, donde este es fecundado dando como resultado la formación del cigoto (única fase diploide), seguidamente en el lumen del intestino medio se forma el ookiquineto, la forma móvil del parásito, el cual se dirige a la lámina basal del intestino para transformarse en un ooquiste (forma no móvil). Por último este ooquiste libera cientos de esporozoitos haploides en las glándulas salivales del mosquito (47). Los esporozoitos son transmitidos al hospedero humano por medio de otra picadura (48).

El ciclo asexual comprende 2 fases, la primera es la pre-eritrocítica, y la segunda la eritrocítica. La fase pre-eritrocítica empieza cuando el esporozoito ingresa al hígado (tarda entre 30 a 60 minutos en llegar a este órgano) y luego cada esporozoito genera entre 10000 a 30000 mil descendientes contenidos dentro de una estructura como quiste denominada esquizonte hepático (45). Después estos esquizontes liberan a los merozoitos que van al torrente sanguíneo a invadir a los eritrocitos, dando inicio a la fase eritrocítica. Sin embargo, exclusivamente en *P. ovale* y *P. vivax* algunos merozoitos se quedan alojados en el hígado formando un estadio durmiente llamado hipnozoito (49), el cual puede reactivarse semanas, meses o años después causando los relapsos (50). Una vez que el merozoito ha invadido al eritrocito este se convierte en un trofozoito joven y luego en adulto. Seguidamente este estadio sufre cambios para formar el esquizonte que contiene de 8 a 24 merozoitos (45), después este

esquizonte libera a estos merozoitos, que rompen el glóbulo rojo, para salir nuevamente al torrente sanguíneo y seguir con su expansión e invadir otros eritrocitos (48). Sin embargo, un grupo de estos merozoitos se convierte en gametocitos, y estos gametocitos nuevamente son ingeridos por el mosquito para continuar con la transmisión (48).

3.3.2 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE *Plasmodium vivax*

Eliminar a *P. vivax* es uno de los grandes desafíos de la lucha contra la malaria. Esto posiblemente se deba al poco conocimiento de su biología y ciertas particularidades en su ciclo de vida a comparación con las otras especies de *Plasmodium spp.* (51). Una particularidad de este parásito es producir infecciones asintomáticas (52). Esto propicia que los individuos “sanos” no busquen tratamiento y por consiguiente se conviertan en reservorios de la transmisión (53). Asimismo, los asintomáticos cuya proporción se ve incrementada en épocas de baja transmisión, permiten la continuidad de la transmisión de manera local, y constituyen un riesgo ya que pueden exportar nuevas infecciones hacia otras zonas (53), donde quizás la malaria este controlada, lo que produciría el riesgo del resurgimiento de casos.

La Amazonia Peruana presenta un gran número de individuos asintomáticos que pasan desapercibidos a los sistemas de vigilancia del MINSA. Esto se observó en las comunidades de Lupuna y Cahuide, donde cerca del 77.2% de las infecciones por *P. vivax* detectadas por

PCR eran asintomáticas (54). Sin embargo, estas cifras se reducen cuando se usa otra herramienta de detección como por ejemplo la microscopia, que sólo detectó un 25% de los casos asintomáticos (8). En otro estudio, el 94% de todas las infecciones producidas por este mismo parásito no presentaron fiebre (55).

Por otro lado, existe variación en conceptualizar que es un asintomático. Por ejemplo, en la Amazonía un asintomático se define como un individuo que no presenta fiebre (Temperatura <37.5 °C) y tiene parásitos de malaria circulando en su torrente sanguíneo. Sin embargo, en otros estudios definen un asintomático como la detección de parásitos asexuales y sexuales y la ausencia de cualquier síntoma clínico agudo (usualmente fiebre, temperatura ≤ 37.5) durante un marco de tiempo específico. Del mismo modo, otros investigadores consideran la persistencia de estadios asexuales al menos dos semanas sin producir algún síntoma. También otros investigadores lo definen en base a la cuantificación parasitaria con un punto de corte, no tener síntomas clínicos con gota gruesa positiva y asintomático por al menos cinco días durante un tiempo de seguimiento (56,57). Por lo tanto, aún sigue en debate por definir que es un individuo asintomático con esta infección.

Existen muchos factores que causan la malaria asintomática producida por *P. vivax*. Entre estos podemos mencionar a la inmunidad no esterilizante, tal vez es una de las principales causas, esto se debe a la

frecuente exposición de los individuos al parásito y sobre todo en escenarios de alta transmisión (56). Por ejemplo, un estudio de vigilancia serológica realizado en tres comunidades alrededor de ciudad de Iquitos mostró que la seroprevalencia se incrementa con la edad de los individuos, encontrando una alta sero-exposición a *Plasmodium vivax* (23). Por lo tanto, la continua exposición al parásito facilita la maduración del sistema inmunológico que controla la carga parasitaria, para que el individuo no llegue al umbral pirogénico y no se produzcan los síntomas clásicos de los pacientes con malaria (58).

Otra particularidad de *Plasmodium vivax* es producir bajas densidades parasitarias, quizás porque solo tiene preferencia por invadir eritrocitos jóvenes (reticulocitos), y esta población celular representa del 2 - 5% de toda la población total de eritrocitos (59). Los asintomáticos también se caracterizan por presentar bajas parasitemias, por ejemplo el 40% de las infecciones detectadas por microscopia y qPCR (PCR cuantitativo) en 4 comunidades de las cuencas de Mazán y Napo, ubicados fuera de la ciudad de Iquitos, tuvieron parasitemias por debajo de 5 parásitos/ μ l (55). Las parasitemias asintomáticas pueden clasificarse en microscópicas y submicroscópicas. La parasitemia microscópica, se refiere al número de parásitos que pueden ser detectados por microscopia, mientras la parasitemia submicroscópica es el número de parásitos que pueden ser detectado solo por PCR pero no por microscopia (56). Estas dos parasitemias pueden variar de acuerdo a cada escenario de transmisión, es decir que en épocas de alta

transmisión aumenten la parasitemia microscópica y en escenarios de baja transmisión se incrementan la parasitemia submicroscópicas (53).

Por otro lado, se ha documentado la presencia de relapsos o infecciones recurrentes por *P. vivax* (50), estos son producidos por el estadio hipnozoito que se aloja en el hígado de los pacientes infectados, y hasta la fecha no se conoce el mecanismo que controla la aparición del relapso y que factores determinan su periodicidad (60). También se ha reportado, que las cepas de *P. vivax* de regiones tropicales presentan múltiples relapsos con cortos periodos de latencia (3-5 semanas), y esto puede evidenciarse en el 76% de las infecciones recurrentes reportadas en San Carlos, una comunidad de la ciudad de Iquitos, y el análisis de las relaciones genéticas en este mismo trabajo evidencian que el 45% de estas infecciones se juntaron en un solo haplogrupo, sugiriendo una alta probabilidad que sean relapsos (61). Por otro lado, las cepas de regiones templadas frecuentemente tienen un largo periodo de incubación y de latencia (5 - 10 meses), y están menos asociadas con los relapsos (62). Por lo tanto, esta particularidad de ocultarse por periodos cortos o largos permiten al parásito una mayor dispersión geográfica, debido al movimiento de personas infectadas, y también evadir las estrategias de control implementadas por los Programas Nacionales de Malaria (63).

Estudios de genotipificación en Brasil, donde la intensidad de transmisión es alta, demostraron que la reactivación de los hipnozoitos

son producidas por cepas heterólogas, es decir que la segunda infección es producida por clones genéticamente diferentes a la primera infección aguda (60,62,64).

En escenarios de alta y baja transmisión se encuentran las infecciones policlonales (52), las cuales se producen porque dentro de una misma infección se encuentran clones genéticamente diferentes. Estas infecciones se producen porque un mosquito con una sola picadura puede transmitir dos o más genotipos distintos, denominado co-infecciones (65,66), otra manera de que ocurran infecciones policlonales es debido a picaduras independientes de varios mosquitos, llamado super-infecciones (65,67).

Por tanto, estos dos tipos de infecciones (co-infecciones y super-infecciones) permiten el incremento o mantenimiento de la diversidad parasitaria (52).

3.4 CONCEPTOS DE GENÉTICA POBLACIONAL

La genética poblacional es el estudio de la distribución y la organización de la diversidad genética en el espacio y en el tiempo, asimismo estudia las variaciones genéticas que existen entre los individuos que pertenecen a una misma población, y las fuerzas evolutivas que resultan en cambios evolutivos entre los individuos a través del tiempo (68). Las variantes genéticas permiten a los individuos poder adaptarse y sobrevivir a los diferentes cambios ambientales de su entorno (69).

Los procesos que permiten las nuevas variaciones genéticas son la mutación, migración y el proceso biológico de recombinación. En genética poblacional una mutación es cualquier cambio heredable en el material genético, asimismo incluye un cambio en la secuencia nucleotídica de un simple gen así como la formación de un re-arreglo en un cromosoma debido a una inversión (un segmento cromosómico cambia de sentido dentro del propio cromosoma) o translocación (desplazamiento de un segmento del cromosoma a un nuevo lugar del genoma) (70).

La migración es el movimiento de organismos (o sus gametos) entre las poblaciones, este movimiento permite que las poblaciones se interconecten entre sí. Si existe un flujo genético exitoso, las poblaciones compartirán alelos y nuevas variantes (71).

Gracias a la migración, las variantes genéticas pueden expandirse a través del tiempo entre las poblaciones. Un flujo exitoso también es considerado si los descendientes del migrante pueden crecer y reproducirse dentro de su ambiente, y esto permite una adaptación local así como una evolución adaptativa en escenarios complejos (70). Por otro lado, existen dos tipos de reproducción, la reproducción sexual y la asexual. La primera permite que los gametos de ambos padres se recombinen, mientras que la segunda no, y este último genera clones genéticamente similares. El evento de la recombinación permite la generación de nuevas variantes genéticas en la población

(72). Todos estos eventos mencionados hacen posible el incremento de las variantes génicas y como consecuencia el aumento de la diversidad genética.

Sin embargo, existen otras fuerzas evolutivas que permiten moldear a las variantes pre-existentes en una población a través del tiempo. Entre estas fuerzas se encuentran la deriva génica y la selección natural. La deriva génica es un proceso que cambia las frecuencias alélicas al azar, es decir no tienen direccionalidad hacia una variante en particular (63,71). Asimismo, la deriva genética permite que se pierdan o se fijen alelos en la población y la ocurrencia de esto dependerá de su frecuencia inicial (70). Por otro lado, la deriva génica es producida por el error de muestreo durante la reproducción (70). Su efecto también se incrementa cuando las poblaciones son pequeñas, esto como resultado de un cuello de botella o la presencia de subpoblaciones. Solo nuevas mutaciones o migrantes dentro de la población pueden reintroducir variaciones (71).

Otra fuerza evolutiva es la selección natural, a diferencia de la deriva génica, la selección si tiene direccionalidad, debido a que actúa sobre aquellas variantes que le otorgan una ventaja reproductiva a una especie, es decir aquellas variantes que mejoran su supervivencia y reproducción en una población a través del tiempo (63,70,71). La selección actúa sobre el fenotipo y no en el genotipo, y el fenotipo es determinado por muchos genes que interactúan unos con otros, así

como con diversos factores del medio ambiente (70). En conclusión, la deriva génica y la selección permiten fijar, mantener o perder una variante genética preexistente a través del tiempo en una población, trayendo como consecuencia algún efecto en la diversidad genética.

En estudios de genética poblacional, se han propuesto varios modelos poblacionales ideales, uno de esos modelos poblacionales es el modelo en equilibrio Hardy-Weimberg, el cual se caracteriza por la presencia de panmixia y usencia de fuerzas evolutivas como la mutación, la migración y la selección natural, esto permite que no se produzcan cambios en las frecuencias alélicas y las genotípicas de generación en generación, este principio se resume en la sumatoria de la frecuencia de dos alelos debe ser uno ($p + q = 1$) (70). También, este modelo poblacional asume que los individuos tienen reproducción sexual y el tamaño poblacional es infinita, y esto permite que no ocurra cambios en la frecuencia alélica propiamente por error de muestreo (70,71). Sin embargo, muchos de los organismos no cumplen estos principios propuestos por este modelo poblacional como por ejemplo el *Plasmodium spp.*

La diversidad genética puede ser representada por varias medidas. Por ejemplo, la medida de la Heterocigocidad esperada (H_e), establecida por Nei en 1973 (73), el cual definió la diversidad (Heterocigocidad), como la probabilidad que dos individuos escogidos al azar de la misma población sean diferentes entre sí. La diversidad genética de Nei están

basadas en los cambios de las frecuencias alélicas encontradas en toda población y asume que los microsatélites varían bajo el modelo evolutivo de alelos infinitos (IAM por su siglas en inglés: *Infinite Allele Model*) (73). El modelo de IAM, asume que la mutación de un microsatélite genera un nuevo estado alélico que nunca ha existido previamente en la población, asimismo bajo este modelo no se presenta el fenómeno de homoplasia. Alelos microsatélites homoplásicos son idénticos en estado (longitud) pero diferente en descendiente, debido a mutaciones convergentes (74). Otro modelo que mejor explica la evolución de los microsatélites es el de un solo paso (SMM, por sus siglas en inglés: *Stepwise Mutation Model*). Este modelo, asume que la mutación de un microsatélite tiene la misma probabilidad de ganar o contraer una unidad repetida y este modelo asume la existencia de alelos microsatélites homoplásicos (74).

La diversidad genética, puede ser explicada por el número de alelos efectivos en la población. El número de alelos efectivos, es el número de alelos necesarios y con igual frecuencias que permiten explicar la misma diversidad genética si todos los alelos estuvieran con la misma frecuencia. Por ejemplo, cinco alelos cada uno con frecuencia igual a 0.2 contribuirá más a la diversidad ($H_e = 0.8$) que cinco alelos con diferentes frecuencias 0.92, 0.02, 0.02, 0.02 y 0.02 ($H_e = 0.152$) (75). Asimismo, esta métrica genética es menos sensible al tamaño de muestra (75). Por tanto, esta métrica es ideal para conocer el efecto de las intervenciones en la diversidad genética parasitaria.

Otro estimador utilizado en genética poblacional es el desequilibrio de ligamiento, este valor conceptualmente representa la asociación no aleatoria de alelos que se segregan con mayor frecuencia de diferentes loci (76). El desequilibrio de ligamiento entre alelos de dos loci se representa como la diferencia (D) entre la frecuencia del haplotipo observado (f_{AB}) menos la frecuencia del haplotipo esperado ($f_A \cdot f_B$) (77). El valor de D varía de 0 a 1. Si el valor es diferente de cero entonces se encuentra en desequilibrio de ligamiento, y si el valor es cero y es una asociación aleatoria entonces están en estado de equilibrio de ligamiento (70). Una medida de resumen de D, es el Índice de Asociación Estandarizada (I_A^S) que permite evaluar los alelos de múltiples loci analizados. Por otro lado, el desequilibrio de ligamiento permite estimar de manera indirecta la presencia de autogamia en la población (67). La autogamia se produce porque dos especies genéticamente relacionadas se reproducen entre sí. Por ejemplo, los parásitos que producen la malaria tienen una fase de reproducción sexual que ocurre dentro del mosquito y si dos parásitos genéticamente relacionados se reproducen, entonces no habrían cambios genéticos en sus descendientes. Por otro lado, cuando el parásito se encuentra en el humano, la reproducción es de tipo asexual y generan clones genéticamente muy similares dentro de una misma infección (46).

Existen muchos factores que permiten el incremento del desequilibrio de ligamiento, es decir que dos alelos se segreguen juntos con mayor

frecuencia y no el azar. Entre estos factores tenemos la asociación física de loci en el mismo cromosoma, la autofertilización y el apareamiento entre clones genéticamente similares, que a su vez incrementa la homocigocidad y este causa una reducción en el ratio efectivo de recombinación (78). La única forma de romper el desequilibrio de ligamiento es mediante la recombinación genética.

Toda población presenta una tasa mutacional (θ). Teóricamente, este parámetro estima el número nuevos alelos diferentes esperados en una siguiente generación debido a la reproducción. Asimismo, *teta* es dependiente del número efectivo poblacional y la tasa de mutación presente en cada locus ($\theta = N_e \cdot \mu$). Cabe señalar que cada locus o cada variante presenta una tasa mutacional diferente dentro de cada individuo. Si por ejemplo analizamos los microsatélites estos presentan una tasa mutacional específica para malaria. *Plasmodium vivax* presenta una tasa mutacional de 5.32×10^{-3} y 3.77×10^{-2} .

La diversidad genética (H_e) y el N efectivo poblacional pueden ser afectados por un cuello de botella. Un cuello de botella es un evento producido por desastres naturales e intervenciones antrópicas que producen un efecto negativo en las poblaciones. Esto trae como consecuencia una rápida disminución del número de alelos y sobre todo en aquellos alelos raros a comparación de la Heterocigocidad (79). Estas consecuencias producidas por estos eventos serian favorables desde el punto de vista de las enfermedades, debido a que

evidenciarían el efecto de una intervención de manera positiva sobre las poblaciones parasitarias.

Si la población es pequeña y el cuello de botella persiste por mucho tiempo, entonces su efecto será más rápido (80). Existen muchos programas que permiten evaluar un reciente cuello de botella, entre estos tenemos a “Bottleneck”. Este programa hace una contrastación de la Heterocigocidad esperada, exceso de heterocigotos, con la Heterocigocidad esperada bajo el equilibrio mutación - deriva génica calculado del número de alelos esperados (79).

Por otro lado, dentro de las diferentes áreas geográficas pueden establecerse varias subpoblaciones. Esto es importante que se cuantifique para conocer si la diversidad poblacional se explica dentro o entre las poblaciones. Para poder estimar y cuantificar se puede usar el estadístico de Wright F_{st} . Este estadístico es definido como la correlación entre dos alelos escogidos aleatoriamente dentro de subpoblaciones en relación al muestreo aleatorio de alelos de la población total. Asimismo, este índice de resumen permite evaluar si las subpoblaciones se diferencian en sus frecuencias alélicas (70).

Después de Wright, se han desarrollado otros indicadores de diferenciación genética como el G_{st} (Nei 1973), o el R_{st} desarrollado para marcadores altamente polimórficos como los microsatélites. El G_{st} se calcula en base a la diversidad genética total (H_t) y la diversidad promedio sub-poblacional (H_s) ($G_{st} = (H_t - H_s)/H_t$) bajo el equilibrio

Hardy-Weinberg (81). Sin embargo, el G_{st} presenta limitaciones cuando se usan marcadores con alta tasa mutacional y un alto polimorfismo (82). Esta particularidad de los microsatélites trae como consecuencia el incremento de la heterocigocidad dentro de una subpoblación, permitiendo una sub-estimación del G_{st} , debido a que este no toma su máximo valor y por tanto se limita al promedio de la homocigocidad ($1 - H_s$) dentro de una sub-población (81,82). Estas limitaciones del G_{st} hacen difícil su uso como estimador indirecto del flujo genético ($Nem \approx ((1/G_{st}) - 1)/4$), porque también se produce una sobre-estimación de la conectividad entre subpoblaciones (81).

Para superar el inconveniente del G_{st} , Jost (2008), propuso una nueva medida de diferenciación genética (D), la cual está basada en medir la diversidad genética por el número efectivo de alelos y particionar esto multiplicativamente dentro de los componentes de la subpoblación es decir dentro y entre subpoblaciones ($D = ((H_t - H_s) / (1 - H_s)) (S / (1 - S))$), Su cálculo se basa en medir la diferenciación poblacional; pero de manera independiente de la heterocigocidad (H_s) del marcador, por tanto el D jost no se sub-estima cuando se usan los microsatélites y asimismo se puede utilizar para evaluar de manera indirecta el flujo genético ($M \approx (1 - D) / D$) (81–83).

Para la interpretación del F_{st} se han sugerido valores que se sitúan en un rango de 0-0.05, que indica baja diferenciación genética, un valor entre 0.05-0.15, moderada diferenciación, un valor entre 0.15-0.25, alta

diferenciación y valores por encima de 0.25 muy alta diferenciación (70,84).

Otra manera de evaluar la presencia de subpoblaciones, es mediante el análisis molecular de la varianza (AMOVA), este método analiza grupos jerárquicos directamente de una matriz de distancias euclidianas al cuadrado entre todos los pares de individuos (85,86). Se requiere conocimiento previo de la población para comparar la varianza molecular de grupos jerárquicos establecidos bajo asunciones que no siempre son verificables (86). Se necesita elaborar una prueba de hipótesis para determinar si existe diferencias dentro y entre los grupos jerárquicos.

3.5 DIVERSIDAD GENETICA DE *Plasmodium vivax*

Los marcadores moleculares son herramientas que permiten explorar el genoma. Uno de estos marcadores son los microsatélites que se caracterizan por ser neutrales, codominantes, fáciles de reproducir y altamente polimórficos (87). El polimorfismo ocurre por la adición o delección de la unidad repetida en vez de sustituciones de nucleótidos. Estos eventos de adición o delección se producen por resbalamiento de la polimerasa durante a replicación, que permite ganar o contraer uno o más unidades repetidas, también pueden ocurrir por desigual “crossing over” (74). Los microsatélites presentan un alto ratio de mutación entre 10^{-3} y 10^{-6} mutaciones por generación celular (88). Adicionalmente, las regiones flanqueantes a los microsatélites son mayormente

conservadas y el motivo repetido es altamente variable entre diferentes especies y diferentes entre individuos de la misma especie (87), debido a las características mencionadas, los microsatélites son idóneos para el estudio de la genética poblacional de *Plasmodium vivax*.

Plasmodium vivax presenta una amplia distribución geográfica a nivel mundial, también una alta diversidad genética. Trabajos realizados en Asia, África mostraron una elevada diversidad genética en las poblaciones asiáticas (Myanmar y Sri Lanka $He = 0.84$ y 0.86 respectivamente), seguido de África ($He = 0.75$), ambas poblaciones presentaron estructuración poblacional, un 70% de las infecciones presentaron ancestro Africano, y un 64% de muestras tuvieron ancestro asiático (89). Otro estudio comparativo dentro del Pacífico Sur, mostró que pese a la intensificación de sus intervenciones, encontraron una alta diversidad genética ($He = 0.69-0.98$), acompañado de una moderada diferenciación genética poblacional ($F_{st} = 0.14-0.15$), y una baja estructuración población ($k=2$), sugiriendo que es necesario continuar con las intervenciones entre países y enfocarse en los asintomáticos como reservorios de la transmisión (90).

Los países de América del Sur, como Colombia, Perú y Brasil, presentan alta diversidad y una población estructurada, con reproducción del tipo clonal (91–93). En Colombia evidenciaron indirectamente el flujo genético entre 04 localidades de alta transmisión, y este flujo genético mantiene en promedio una la alta

diversidad local ($H_e = 0.978$) y restaura la sub estructuración de la población parasitaria ($F_{st} = 0.05 - 0.13$) con un desequilibrio de ligamiento significativo ($p < 0.05$) (93).

En Perú, en las comunidades asentadas cerca de la ciudad de Iquitos, se reportó algo similar, en promedio alta diversidad parasitaria $H_e = 0.74$ (rango 0.66-0.76), siete poblaciones parasitarias estructuradas con desequilibrio de ligamiento significativo ($p < 0.001$) y un modelo de migración panmítico, donde todos los parásitos se mueven entre estas comunidades y aleatoriamente se reproducen entre si (91). Asimismo, en las cuencas de Mazan y Napo, también se mantiene una alta diversidad parasitaria ($H_e = 0.71$ y 0.4 en Mazan y Napo respectivamente), esto debido a la movilización humana que permite la importación de casos y las condiciones de receptividad de la zona permiten que estos parásitos puedan fijarse y expandirse en las comunidades del Mazan y en menor proporción en Napo (63).

Por último, en Brasil se encontró una alta diversidad parasitaria ($H_e = 0.69$) y tres poblaciones parasitarias circulantes con alto desequilibrio de ligamiento ($I^S_A = 0.04$), sugiriendo una expansión clonal de los parásitos de haplotipos relacionados durante un brote (92).

3.6 REPRODUCCIÓN DE *Plasmodium spp.*

La complejidad del ciclo de vida del *Plasmodium* permite que una parte de su vida se desarrolle en el mosquito y la segunda parte en el hospedero humano. En el mosquito, el parásito se comporta como un

organismo diploide mientras que en el humano es un organismo haploide (94). Entonces bajo estas premisas se considera que *Plasmodium spp.* se reproduce de manera sexual (recombinación) en el mosquito y asexual (por múltiple fisión) en su hospedero.

Cerca de 1990 se creía que el *Plasmodium spp.* era una especie panmítica (recombinación aleatoria dentro de la población) (95). Sin embargo, recientes investigaciones han encontrado una frecuente estructuración poblacional de tipo clonal, vinculado a un alto desequilibrio de ligamiento, sugiriendo que el *Plasmodium spp.* ha evolucionado de manera clonal (61,91,96–98). Bajo estos hallazgos, Tibayrenc (95), postuló que *Plasmodium vivax* tenía una reproducción del tipo clonal activa (en construcción), es decir que prefiere autofertilizarse para ganar adaptación biológica y evolutiva a su medio ambiente, pese a que cabe la posibilidad de recombinación con clones simpátricos no relacionados; pero esto no es frecuente en cada generación. Esta teoría pudiese estar facilitando su expansión en su medio ambiente (95).

Por otro lado, la recombinación restringida pero no ausente en *Plasmodium spp.*, se produciría por parásitos que se encuentran en coinfecciones o super-infecciones (99–101). Una coinfección se produce por la picadura de un solo mosquito que trasmite clones genéticamente diferentes y una super-infección se produce cuando dos o más

mosquitos pican al mismo hospedero y le transmiten parásitos genéticamente diferentes por cada picadura (100).

Estos parásitos al ser genéticamente diferentes pueden nuevamente ser absorbidos por el mosquito, durante su alimentación del hospedero, y como consecuencia estos parásitos genéticamente diferentes pueden recombinarse entre ellos (101). Sin embargo, se cree que en el humano no ocurre este evento, y su reproducción es simplemente clonal.

IV. JUSTIFICACIÓN

La OMS propuso a los 90 países del mundo, incluido el Perú, el reto de eliminar la malaria a nivel nacional, regional y global hasta llegar a su erradicación. Para lograr este objetivo, se ha propuesto la implementación de estrategias de control de la malaria (102).

Las estrategias de control basada en el detección activa y pasiva de casos deben tener una buena cobertura a nivel local (23), y sobre todo focalizarse en los factores de riesgo como la población de asintomáticos y la población migrante, quienes pueden mantener, transmitir y propagar la malaria (6,103). Asimismo, para poder medir y monitorear la efectividad de una nueva estrategia, es necesario contar con herramientas efectivas de medición. No solo basta medir la reducción en la incidencia o prevalencia de los casos de malaria, que son métricas comúnmente usadas en el campo epidemiológico (104), sino evidenciar su efecto directo en la población parasitaria, y para ello se puede utilizar las métricas genético poblaciones.

Medir el efecto de las estrategias de control en la diversidad genética de la población del parásito permitirá conocer el cambio en la diversidad en las poblaciones circulantes y permitirá explicar y entender el porqué del cambio en el tiempo. Este trabajo otorgará información sobre la presencia de clones con mayor adecuación que se expandan dentro de la población, el cual sería un indicio de alguna ventaja adaptativa (clonas con nuevas variantes antigénicas o

resistentes a drogas) (105). Del mismo modo permitirá conocer el origen de las infecciones, y si estas son clones propios de la zona o si son importados, siendo estos últimos relevantes ya que pueden hacer resurgir la malaria en regiones vulnerables. Finalmente se podrá conocer si existe un flujo genético entre las diferentes comunidades, permitiendo deducir la dispersión de los parásitos y determinar si las estrategias deben ser implementadas a nivel local o distrital.

Asimismo, este trabajo de investigación generará evidencia científica del efecto de tres estrategias control sobre la diversidad genética y su reproducción, y esto permitirá a las autoridades decisoras de las políticas de salud para que puedan adaptar o mejorar estas estrategias para su posible implementación en los nuevos programas de vigilancia y control de la malaria.

V. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

5.1 HIPOTESIS

La estrategia basada en la detección activa de infecciones de malaria por PCR en tiempo real reduce la propagación parasitaria y disminuye la diversidad genética de la población de *Plasmodium vivax*, en comparación con las estrategias basadas en la detección por microscopia.

5.2 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar y monitorear el efecto de tres estrategias de control implementadas por el Proyecto Círculos hacia la eliminación de la malaria en el Perú, en la diversidad genética y la reproducción de *P. vivax* en las cuencas del Napo y Mazán.

5.3 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Diagnosticar y Genotipificar los casos de *Plasmodium vivax* detectados por PCR en tiempo real en los diferentes tiempos de muestreos y las tres estrategias de control.
- Medir la diferenciación genética (FST) de las poblaciones circulantes de *P. vivax* en el primer punto de muestreo entre las tres estrategias de control implementadas.
- Medir el efecto de las tres estrategias de control, en tres puntos de muestreo longitudinal, sobre la Heterocigocidad esperada

(H_e), Tamaño efectivo poblacional (N_e), Desequilibrio de ligamiento e infecciones policlonales.

- Realizar un test de exceso/déficit de heterocigocidad entre las tres estrategias y por cuenca a través del tiempo para evaluar la presencia de un cuello de botella/rápida expansión reciente en la población.
- Comparar el efecto en la reproducción de *P. vivax* al inicio y final del muestreo entre las tres estrategias de control mediante la topología de una red de expansión mínima de haplotipos.

VI. METODOLOGÍA

6.1 Diseño de Investigación.

Este trabajo de investigación es del tipo experimental, analítico, retrospectivo y longitudinal, debido a que se usaron las muestras y el mismo diseño de estudio propuesto por el proyecto de investigación “Costo-efectividad de estrategias optimizadas de detección y tratamiento de infecciones asintomáticas por malaria en la Amazonia Peruana”, desarrollado entre los años 2015 y 2018.

El diseño de estudio consistió en realizar barridos a 15 comunidades ubicadas en las cuencas del Mazán y Napo. Se dividieron en 3 grupos de 5 comunidades, a cada grupo se le asignó de manera aleatoria una estrategia de control específica. Las estrategias que se implementaron y evaluaron en este proyecto de investigación, estaban basadas en los modelos matemáticos propuesto por Rosas-Aguirre y colaboradores (106).

Se utilizaron las muestras colectadas por cada estrategia de control en los meses 0, 12 y 18 que corresponden a Marzo 2016, Marzo 2017 y Setiembre 2017 respectivamente. Los meses 0 (Mes 0) y 12 (Mes 12) corresponden a meses de baja transmisión ($IPA < 5\%$) y el mes 18 (Mes18) corresponde a época de alta transmisión ($IPA > 5$), tal como se observa en la figura 01. Las estrategias de control implementadas en las quince comunidades fueron las siguientes:

La estrategia 01 (Est. 01), está basada en la detección pasiva de casos y el diagnóstico microscópico de infecciones sintomáticas, es decir tratar a aquellos pacientes con síntomas que acuden a los diferentes establecimientos de salud. Se recolectaron muestras en láminas para el diagnóstico por gota gruesa y tratamiento solo a los casos positivos, esto se realizó durante todo el tiempo que duró del estudio. Esta estrategia es empleada por el MINSA en las diferentes comunidades. Adicionalmente se tomó papel filtro con previa autorización del paciente y firma de consentimiento informado.

La estrategia 02 (Est. 02), está basada en la detección activa de casos, que consiste en realizar visitas a las casas en las comunidades, esto por parte de la brigada del proyecto. Se tomó muestras en láminas para la gota gruesa y en papeles filtros a todos los miembros de las familias que firmaron previamente el consentimiento informado. Se trataron a las infecciones positivas por gota gruesa, independiente de la presencia de síntomas. Esta estrategia se realizó 03 meses consecutivos (Marzo, Abril y Mayo en el año 2016), y de igual manera en el año 2017, Sin embargo, en Setiembre 2017 no se aplicó la estrategia, pero si se colectó muestras en papel filtro.

La estrategia 03 (Est. 03), consistió en una búsqueda activa y toma de muestra en papel filtro para el diagnóstico por qPCR. Se dió tratamiento a todos los individuos con infecciones de malaria detectadas por qPCR. Esta estrategia se llevó a cabo en dos meses

consecutivos (Marzo y Abril del 2016) y del mismo modo en el año 2017. Por último, en el mes de setiembre 2017 no se hizo la intervención con esta estrategia, sólo se colectó muestra en papel filtro.

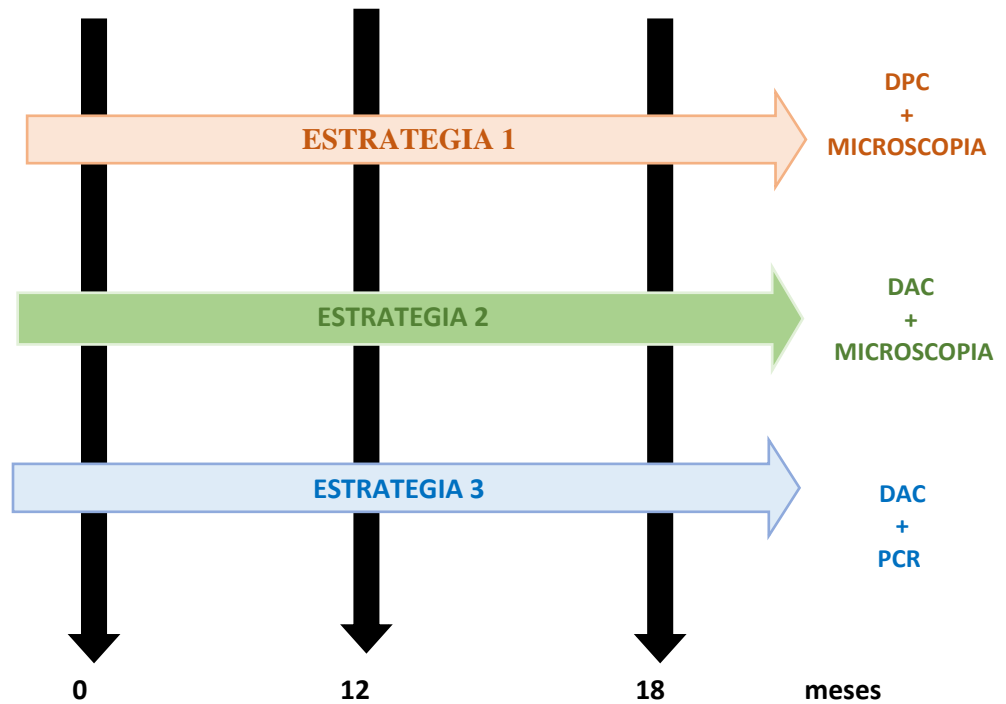


Figura 1: Diseño de la investigación y estrategias de control implementadas: las flechas verticales indican las veces que se hicieron las intervenciones con cada estrategia de control. En el mes 18 no se realizó la intervención, sólo se tomaron muestras.

6.2 ÁREA DE ESTUDIO, POBLACIÓN DE ESTUDIO, SELECCIÓN DE MUESTRAS.

6.2.1 ÁREA DE ESTUDIO

Las muestras evaluadas fueron tomadas en 15 comunidades, ubicadas en las cuencas del Mazán y Napo. Estas cuencas están ubicadas en la zona Norte de la ciudad de Iquitos, Departamento de Loreto. Según los datos del SENAMHI, esta región presenta una temperatura media anual de 27.3 °C, con una precipitación total anual de 2349,9 mm y una humedad relativa anual de 92%. Para acceder a las quince comunidades, es necesario llegar por vía fluvial a treinta minutos desde la ciudad de Iquitos. Del mismo modo, Mazán presenta una temperatura máxima promedio de 31.1 °C y temperatura mínima promedio de 22.32 °C (107).

6.2.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se seleccionaron muestras positivas a *P. vivax* de las comunidades asentadas en las cuencas del Mazán y Napo. Las poblaciones estudiadas pertenecen a las comunidades de Huamán Urco, Primero de Enero, San Antonio, Urco Miraño y Visto bueno. Estas comunidades pertenecen a la estrategia 01. Las comunidades de 14 de Julio, Bello Horizonte, Puerto Abeja, Santa Cruz, Tamanco, pertenecen a la estrategia 02, y finalmente Libertad, Puerto Alegre, Puerto Obrero,

Salvador y Sucusari a la estrategia 03, tal como se observa en la figura

2.



Figura 2: Ubicación Geográfica de las comunidades muestreadas en el estudio

6.2.3 MUESTRAS BIOLÓGICAS

Unidad de Análisis: Estrategias de control

Unidad de muestreo: Muestra positiva a *P. vivax*, que cumpla con los criterios de inclusión.

Debido a que este estudio es del tipo retrospectivo y no prospectivo, no se realizó el cálculo del tamaño muestral. Por otro lado, las muestras fueron colectadas, con el uso de lancetas retractiles para los niños y lancetas convencionales estériles para

los adultos. Se realizó una picadura del dedo medio de la mano que menos utilizan las personas. Se colectó entre 3 a 4 gotas de sangre y se impregnó en papel filtro, se dejó secar a temperatura de ambiente y luego se almacenó en bolsas ziploc herméticamente cerradas y luego fueron transportados al laboratorio de Malaria, donde estuvieron almacenados a -20 °C para los análisis.

Adicionalmente se incorporaron al análisis 76 muestras de *Plasmodium vivax*, estas muestras correspondían a un estudio previo realizado en el año 2015 en la comunidad de Libertad (63), y que sirvieron como un punto de referencia, previo a la implementación de la estrategia tres.

6.2.4 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLES INDEPENDIENTES.

- **Estrategias de control:** Estrategias 01, 02 y 03
- **Tiempo de muestreo:** Años de colección, Marzo 2016 (Mes0), Marzo 2017 (Mes12) y Setiembre 2017 (Mes18)

VARIABLES DEPENDIENTES

- **Diferenciación Poblacional:** Estimado mediante el D de Jost, el cual es un análogo al Fst de Wright, es una variable cuantitativa, valor de 1 indica poblaciones completamente diferentes, valor de 0 poblaciones iguales (panmixia).

- **Diversidad genética:** Variable cuantitativa, estimada mediante Heterocigocidad esperada (H_e), fluctúa de 0 a 1, 0 no hay diversidad genética, y 1 alta diversidad genética.
- **Desequilibrio de ligamiento:** Variable cuantitativa, estimado mediante el Índice de Asociación Estandarizado (I_A^S). Fluctúa en valores de 0 a 1. Valor de cero indica equilibrio de ligamiento y valores de 1 desequilibrio de ligamiento alto.
- **Numero de alelos efectivos:** Variable cuantitativa, varía de cero hasta el infinito. Es la cantidad de alelos que explican la diversidad genética.
- **Infecciones policlonales:** Variable dicotómica cualitativa, presencia o ausencia.
- **Distancia genética:** Es una variable cuantitativa, estimado mediante distancia genética de Bruvo, fluctúa de 0 a 1. Valor de uno indica 100% que son genomas diferentes, y un valor de cero los genomas son iguales.
- **Exceso de heterocigotos:** Variable tipo cuantitativa, estimado mediante la heterocigocidad esperada, con respecto a la Heterocigocidad en equilibrio de mutación-deriva génica.

6.2.5 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

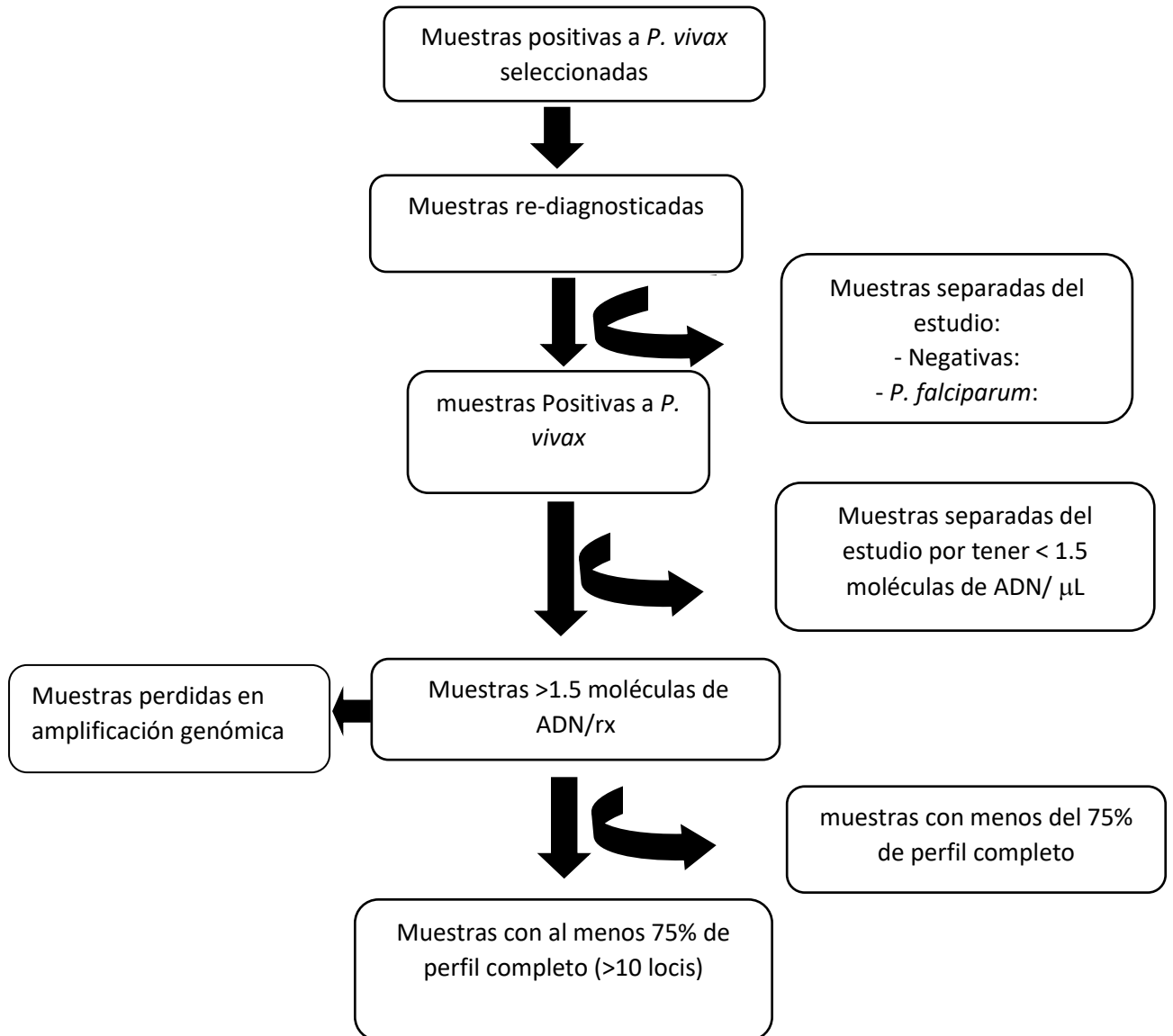
Criterios de exclusión:

- Muestras con infecciones mixtas o positivas a *P. falciparum*.
- Muestras negativas después de un re-diagnóstico.
- Muestras con parasitemias menores a 1.5mol de ADN/ μ l o que presentaron Ct mayor a 33.

Criterios de Inclusión

- Muestras positivas a *P. vivax*
- Muestras con parasitemias mayor a 1.5 moléculas ADN/ μ l o valores de Ct menor a 33

FIGURA 3: FLUJOGRAMA DE SELECCIÓN DE MUESTRAS



6.3 PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS.

6.3.1 Detección de infecciones por PCR en tiempo Real

6.3.1.1 Extracción de ácidos nucleicos de *P. vivax*

La extracción del material genómico se realizó aproximadamente a partir de 20µl de sangre embebida en papel filtro. Se utilizó el kit de extracción E.Z.N.A blood DNA mini kit, que tiene el principio de extracción mediante columnas de sílica. Se realizó una variación en el protocolo propuesto por el fabricante (108), el cual consistió en adicionar 250µL de buffer de lisis TEN 2X (Tris HCl 1M pH 8.0 NaCl 5M EDTA 0.5 M pH 8.0). Se dejó incubar a 65 °C por una hora en una plancha calentadora (marca eppendorf) con una agitación constante de 450 rpm. Seguidamente, para completar la lisis se agregó 25 µL de proteinasa K y se colocó por treinta minutos adicionales en la plancha calentadora con agitación constante. Se agregó 250 µL de buffer de lisis (BL) y etanol absoluto y se trasvasó en las mini columnas, luego se centrifugó a 8000 rpm por 1min. Posteriormente se procedió a purificar y lavar el ADN con buffer HBC y buffer de lavado respectivamente, se deshidrataron las muestras a 12300 rpm por 2 minutos y por último el ADN fue diluido en 50µl de buffer de elusión con previa incubación a 65 °C por 5 minutos, y por último se guardó a -20 °C para su posterior análisis.

6.3.1.2 Diagnóstico por PCR en tiempo Real

El diagnóstico molecular se realizó de acuerdo al protocolo propuesto por Mangold *et al*, (41) estandarizado en el laboratorio de malaria. Como blanco se utilizó el gen multicopia ARNr 18S y el kit de diagnóstico PerfCTA Sybr Green Fast Mix (Quantabio) y como molécula reportera de señal de amplificación se usó Syber Green. Asimismo, los cebadores propuestos por Mangold tienen las siguientes secuencias: PL1147F18 5'-TAACgAACgAgATCTTAA-3' y PL1679R 5'-gTTCCTCTAAgAAgCTTT-3'. Este PCR permite identificar 04 especies de Plasmodium (*P. vivax*, *P. falciparum*, *P. ovale* y *P. malariae*) en una misma reacción (monoplex), debido a que los cebadores hibridan en una zona conservada del ARNr 18S y mediante el análisis de la temperatura de melting específica, se pueden diferenciar las especies de parásitos.

El PCR en tiempo real fue realizado en un termociclador de marca Biorad CFX Connect, y las condiciones de amplificación consistieron de un ciclo de desnaturalización a 95 °C por 2 minutos; 45 ciclos que consistieron de una temperatura de 95 °C por 20s, temperatura de hibridación de 52 °C por 20s, temperatura de extensión de 68 °C por 30s; y un ciclo de extensión final a 68 °C por 3 min. Posteriormente se analizó la temperatura de “melting” de 65 °C a 85 °C; con 5 s. de tiempo de incremento cada 0.5 °C.

Dentro del sistema de detección se incluyeron controles positivos de extracción para *P. vivax* (muestra de sangre de un paciente positivo con una carga parasitaria aproximadamente de 10 parásitos/ μL), controles negativos (muestra de sangre de una persona que nunca tuvo malaria), y también se usaron controles para la reacción del PCR, esto incluye controles positivos a *P. vivax* y *P. falciparum* y blancos de reacción (agua en reemplazo de ADN).

6.3.1.3 Determinación de la carga parasitaria de *P. vivax*

Se realizó mediante una curva estándar del gen ARNr 18S insertado en el plásmido pGEM-PV- ARNr 18S, e insertado en la bacteria *E. coli* 3DH 5 α . Seguidamente, se extrajo el plásmido, se purificó, cuantificó y diluyó en un factor de 10, obteniéndose seis diluciones seriadas las cuales son expresadas como número de moléculas del plásmido por microlitro de muestra: 2×10^6 mol/ μL , 2×10^5 mol/ μL , 2×10^4 mol/ μL , 2×10^3 mol/ μL , 2×10^2 mol/ μL , 2×10^1 mol/ μL y 2×10^0 mol/ μL . Cada punto de la curva fue evaluado por triplicado.

Las muestras positivas y cuantificadas fueron divididas en cuatro categorías. La primera categoría consistió en aquellas muestras que tenían una concentración mayor o igual a 24 mol/ μL , la segunda categoría incluía las muestras que tuvieron menos de 24 mol/ μL hasta 4 mol/ μL . La tercera categoría incluye muestras entre 1.5 y 4 mol/ μL , y por último las muestras por debajo de 1.5 mol/ μL . Las muestras de la primera categoría se diluyeron hasta 8 mol/ μL , para amplificar los

microsatélites. A las de categoría dos, se les realizó la amplificación genómica y a las dos últimas categorías se les realizó la genotipificación de manera directa sin previa dilución.

6.3.1.4 Amplificación genómica de *P. vivax*

Las muestras positivas que presentaron una baja densidad, es decir una parasitemia entre 4 y 24 moléculas/ μL , se les tuvo que realizar la amplificación del genoma del parásito. Para esto se utilizó la metodología propuesta por Cowell *et al* 2017 (109), y el kit de amplificación genómica “ilustra GenomiPhi V2 amplification (Biolabs). Este protocolo consistió en la mezcla de un set de 10 cebadores pvSET1 50 μM (5-CGTTG*C*G-3, 5-TTTTTTC*G*C-3, 5-TCGTG*C*G-3, 5-CGTTTTTT*T*T-3, 5-TTTTTTTC*G*T-3, 5-CCGTT*C*G-3, 5-CGTTTC*G*T-3, 5-CGTTTC*G*C-3, 5-CGTTTT*C*G-3, and 5-TCGTTC*G*T-3), Los asteriscos de estos cebadores representan un enlace fosforotioato, para evitar su degradación por la actividad endonucleasa de la enzima phi29. Asimismo, se añadió dNTPs 10mM, ADN genómico de *P. vivax*, buffer 10X, suero bovino fetal (BSA) y 5 Unidades/rx de la enzima polimerasa phi 29. El volumen final de la reacción fue de 50 μL .

Las condiciones de amplificación consistieron en un ciclo a 35 °C 10min; 34 °C por 10min; 33 °C por 10min; 32 °C por 10min; 31 °C por 10 min; y 30 °C por 24 horas y una temperatura de 65 °C por 15 min.

Seguidamente los productos de amplificación fueron diluidos cincuenta veces y se volvió a realizar la PCR en tiempo real para evaluar el cambio de Ct. Aquellas muestras que tenían Ct menor que al inicio de la amplificación genómica fueron seleccionados para amplificar los 16 marcadores microsatélites.

6.3.2 Genotipificación de las infecciones por *P. vivax*:

Para la determinación de los haplotipos de los parásitos circulantes en las comunidades, se realizó la genotipificación molecular, para esto se utilizó un panel de 16 marcadores microsatélites. Cinco microsatélites propuestos por Kurunaweera (110), cuatro propuesto por Imwong (74), y siete nuevos marcadores diseñados y publicados por el Laboratorio de malaria (111), los cebadores se diseñaron tomando como genoma de referencia a la cepa Sall1, estos marcadores fueron estandarizados, validados y medidos en infecciones recurrentes de *P. vivax* (112). La información de los microsatélites se encuentra en el anexo 1. Los microsatélites fueron amplificados mediante PCR convencional y el kit Quanta bio (catalogo 95141-01k). Para la observación de los productos de amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa 2% corrido a 90V por 1 hora.

Sólo un cebador de cada par de cebadores fue marcado con un fluoróforo (6-FAM, VIC, NED, y PET) para poder ser diferenciado en la electroforesis capilar.

6.3.3 Electroforesis Capilar:

Previa a la electroforesis capilar se diluyeron diez veces los productos de PCR y se trataron con formamida a 94 °C para mantener los fragmentos de ambas hebras linealizados para que no formen puentes de hidrogeno entre ellos, para este procedimiento se utilizó el protocolo estandarizado por Alarcón 2016 (112).

Para poder discriminar los tamaños de los microsátélites, se realizó la electroforesis capilar en un analizador ABI Prism 3100. Los datos del equipo fueron importados y analizados en el software peak scanner V.10. Se usó el marcador estándar interno LIZ 600 para estimar los tamaños de los alelos (picos) expresado como unidad relativa de fluorescencia (URF). Asimismo, se consideraron aquellos fragmentos con ≥ 30 URF como alelos reales y en caso de alelos secundarios, solo aquellos con $\geq 30\%$ de URF del alelo dominante (112). Si en un solo locus se encontraban dos alelos o picos se consideraban como infecciones policlonales.

Aquellas muestras que presentaron la misma forma de pico y tenían un $URF \geq 30$ y no se encontraban en el rango de tamaño de los alelos comunes reportados previamente, fueron considerados como alelos raros.

6.4 PLAN DE ANÁLISIS.

6.4.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos de la genotipificación fueron registrados en una base de datos en el programa Microsoft Excel, Asimismo, todos los análisis estadísticos fueron realizados en el programa estadístico R versión 3.5.2; que tiene incorporado paquetes para el análisis de la diversidad genética.

Para evaluar la pérdida de muestra por cada estrategia, se utilizó un test de proporciones con una prueba exacta de Fisher con dos colas y un intervalo de confianza al 95%, y un p-valor significativo menor a 0.05. Para el número de marcadores necesarios para la discriminar entre los haplotipos se realizó una curva acumulativa de genotipos, para esto se utilizó el paquete estadístico poppr. incorporado en R

Para comparar en el tiempo las métricas genético poblaciones, como Heterocigocidad, Desequilibrio de ligamiento y el número de alelos efectivos, en el tiempo se realizó un test de Montecarlo con 1000 remuestreos y la significancia estadística fue evaluada con p-valor menor a 0.05. También, para realizar la comparación entre estrategias se utilizó el test de Kruskal Wallis con una significancia estadística p-valor menor a 0.05.

La comparación de la proporción de infecciones policlonales se usó el test exacta de Fisher, la significancia estadística fue definida con un p-valor < 0.05 , con un intervalo de confianza del 95%.

Para evaluar la presencia de flujo genético se utilizó el programa DIVMIGRATE y una significancia estadística de p-valor < 0.05 . Por otro lado, para determinar un reciente cuello de botella, se utilizó el programa BOTTLENECK v1.2.02, y la significancia estadística del evento de cuello de botella, fue evaluado con el test de Wilcoxon, de una y dos colas, la significancia estadística con p-valor < 0.05 .

6.5 CONSIDERACIONES ÉTICAS.

Las muestras que se utilizaron en este proyecto de investigación, previamente ya tenían la aprobación del Comité de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia a través del proyecto “Costo-efectividad de estrategias optimizadas de detección y tratamiento de infecciones asintomáticas por malaria en la Amazonia Peruana de Círculo: hacia la eliminación de la malaria en la Amazonia Peruana”, código SIDISI: 0000066235. Las personas adultas y niños incluidos en este estudio dieron su consentimiento y asentimiento informado respectivamente. Todo el procedimiento para la toma de muestra se hizo siguiendo los lineamientos establecidos en la Declaración de Helsinki.

VII. RESULTADOS

7.1 Diagnóstico y Genotipificación de muestras de *P. vivax*

En total se diagnosticaron 584 muestras positivas a *Plasmodium spp*; para la genotipificación solo se seleccionaron 187 muestras positivas a *P. vivax* con Ct < 34 (anexo 2). La curva de acumulación de haplotipos mostró que es necesario al menos amplificar 10 a más loci para poder discriminar cerca del 100% de los haplotipos (ver anexo 3). Luego de la genotipificación 92 muestras (49%) amplificaron al menos el 62.5% (10/16) del total de loci usados (anexo 2 y 3), 25 (27%) muestras en la estrategia 1, 20 (21.7%) muestras en la estrategia 2 y 47 (51%) muestras en la estrategia 3. Se tuvo en promedio un 16.1% de muestras no genotificables por cada estrategia de control (anexo 4).

Estas 92 muestras fueron utilizadas para todos los análisis genéticos y adicionalmente se incluyeron 76 muestras de un estudio realizado en la comunidad de Libertad (cuenca Mazan, año 2015), para complementar la información obtenida (ver tabla 1).

Todos los marcadores empleados fueron polimórficos. Los marcadores microsatélites Ch2152 y MS20 fueron los más diversos ($He = 0.86$ y 0.851), con once y trece alelos respectivamente; y el marcador Ch2122 fue el menos diverso ($He = 0.51$) con nueve alelos (anexo 1). Se

identificaron 44 (23.5%) infecciones policlonales entre las tres estrategias.

Tabla 1: Tamaño de muestra utilizadas en este estudio

	Mes_0	Mes_12	Mes_18	Total
Línea Base	-	-	-	76
EST. 01	14	4	7	25
EST. 02	9	7	4	20
EST. 03	25	6	16	47

7.2 Diferenciación Poblacional

Medición de la diferenciación genética entre estrategias en el primer punto de muestreo

Según la clasificación de Wright (70), se encontró de moderada a alta diferenciación poblacional entre las tres estrategias ($F_{st} \geq 0.13$). La estrategia 3 mostró la mayor diferenciación con la estrategia 1 ($F_{st} = 0.23$) seguido de la estrategia 2 ($F_{st} = 0.17$) (Figura 4). El test de flujo genético realizado en el paquete DivMigrate indicó ausencia de flujo genético entre estrategias (alfa >0.05) al inicio de la implementación de estas. El análisis molecular de la varianza confirma esta alta diferenciación poblacional, debido a que el 96% de la variación

genética se explica dentro de cada estrategia y solo el 4% de la variación es explicada entre estrategias (anexo 5).

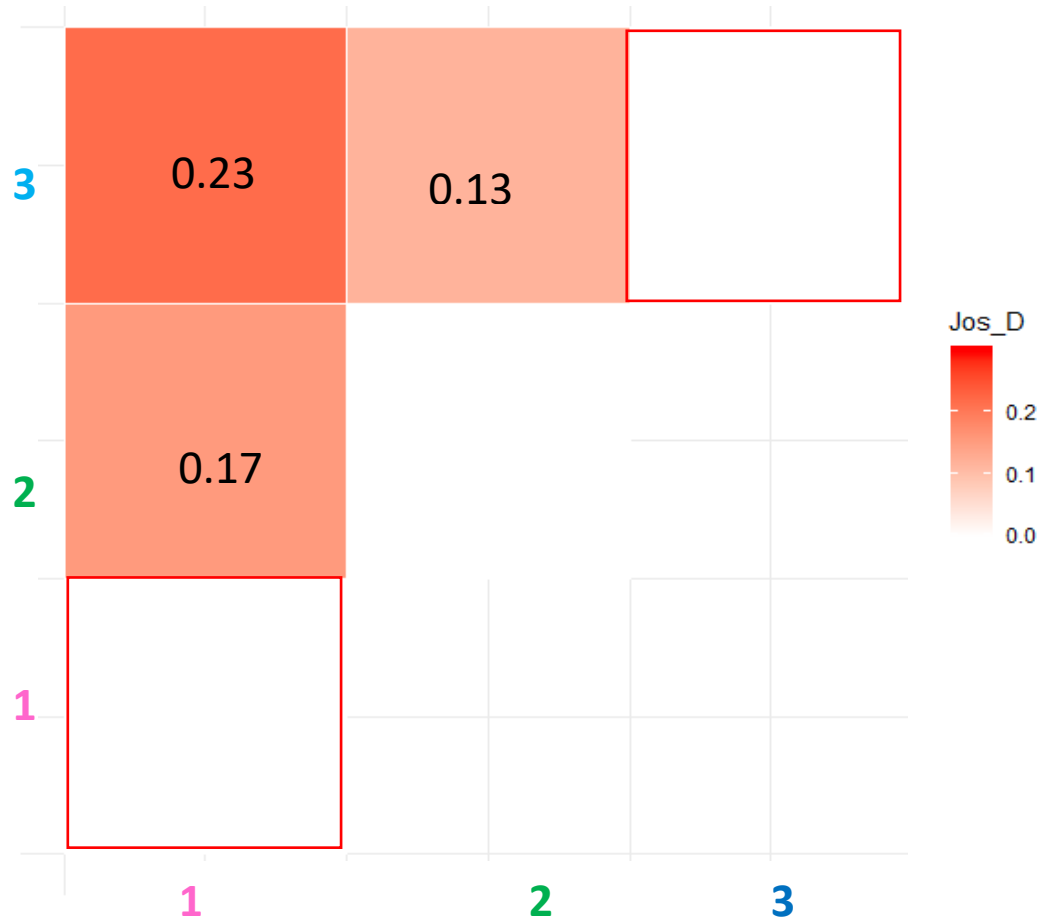


Figura 4: Análisis de diferenciación genética poblacional entre estrategias (Paquete poppr – Programa R)

Medición de la diferenciación genética entre estrategias y tiempo

La figura 5 muestra que existe de moderada a alta diferenciación poblacional ($F_{st} \geq 0.13$) entre las tres estrategias a través del tiempo. Esta diferenciación poblacional fue mucho mayor después de haber implementado las estrategias en los meses doce y dieciocho ($F_{st} \geq 0.17$) en comparación con el inicio de la implementación de las estrategias (Mes 0). Dentro de una misma estrategia la diferenciación poblacional fue elevada ($F_{st} > 0.2$) (anexo 6). Por otro lado, el test de flujo genético realizado mostró que no hubo flujo genético entre estrategias en los Meses doce y dieciocho ($\alpha > 0.05$).

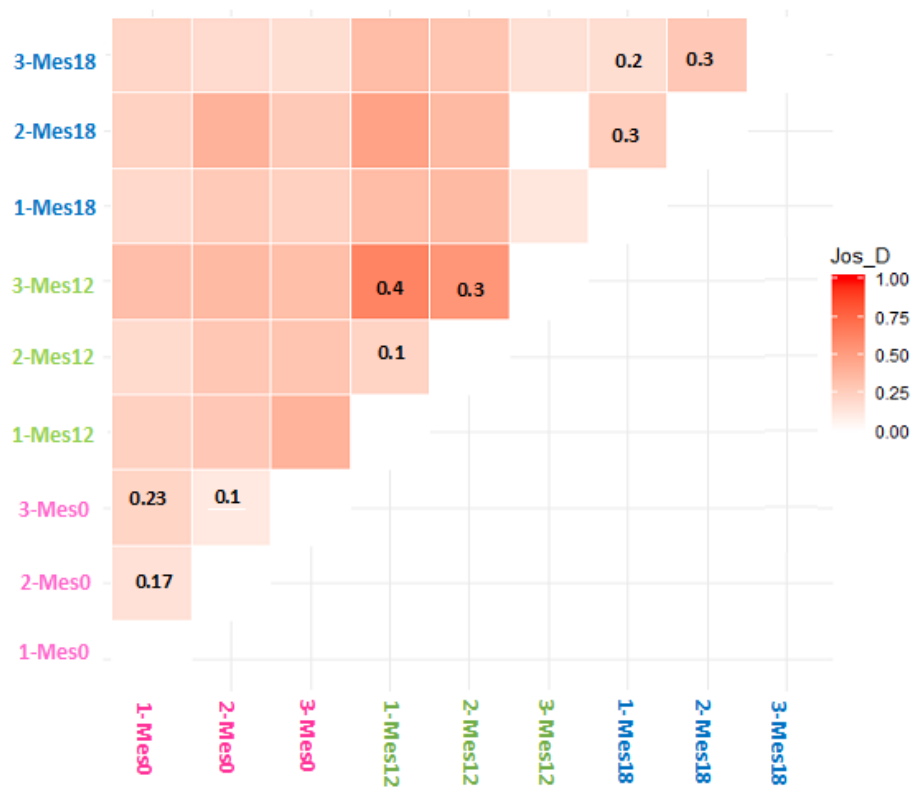


Figura 5: Análisis de diferenciación genética poblacional entre estrategias a través del tiempo (Paquete poprr – Programa R)

7.3 Efecto de las estrategias de control en la diversidad genética

Durante la aplicación de la estrategia 1, se observó una disminución significativa (p -valor < 0.05) del desequilibrio de ligamiento ($I_A^S = 0.155 - 0.003$). En el mes 12, las estrategias 2 y 3 mostraron un incremento del desequilibrio de ligamiento ($I_A^S = 0.074 - 0.120$ respectivamente), pero este no fue significativo (p -valor > 0.05) (figura 6, 7 y 8). Las tres estrategias muestran una tendencia a mantener o incrementar la proporción de las infecciones policlonales, siendo este incremento significativo (p -valor < 0.05 – poder 0.82) solo en el mes 12 de la estrategia 2 (anexo 7). La diversidad genética mostró comportamiento variable entre las estrategias a través del tiempo, tal es así que en la estrategia 1 hubo un incremento significativo (p -valor < 0.05) en el mes 12 ($H_e = 0.802 \pm 0.274$), y una reducción no significativa (p -valor > 0.05) en el mismo mes en la estrategia 3 ($H_e = 0.658 \pm 0.308$). En la estrategia 2, la diversidad genética tuvo un promedio de $H_e = 0.769 \pm 0.081$, con una ligera tendencia a disminuir de manera no significativa (p -valor > 0.05). Patrones similares a la diversidad genética se observaron con el número de alelos efectivos y la tasa mutacional poblacional (θ) entre las tres estrategias, siendo los cambios no significativos (p -valor > 0.05) (anexo 8). Por último, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las métricas genético poblaciones entre estrategias (p -valor > 0.05) (anexo 10).

Análisis adicionales muestran que en la comunidad de Libertad (donde se aplicó la estrategia 3), se presentó en el mes 12, una reducción significativa (p -valor < 0.05) de la diversidad genética (H_e), alelos efectivos y desequilibrio de ligamiento (anexo 11, anexo 12).

También al inicio (Mes0), se encontró una disminución significativa (p-valor >0.05 – poder 0.58) de la proporción de infecciones policlonales comparado con la línea base (año 2015); y durante la aplicación de esta estrategia se encontró una tendencia a incrementar, pero de manera no significativa (anexo 13).

Por último, al inicio de la implementación de la estrategia 1, se encontró un déficit de heterocigocidad (p-valor = 0.001), lo cual indica que no se produjo un reciente cuello de botella en la estrategia 1. No se encontraron recientes cuellos de botellas en la población parasitaria al inicio y después de la implementación de las estrategias 2 y 3 (anexo 14).

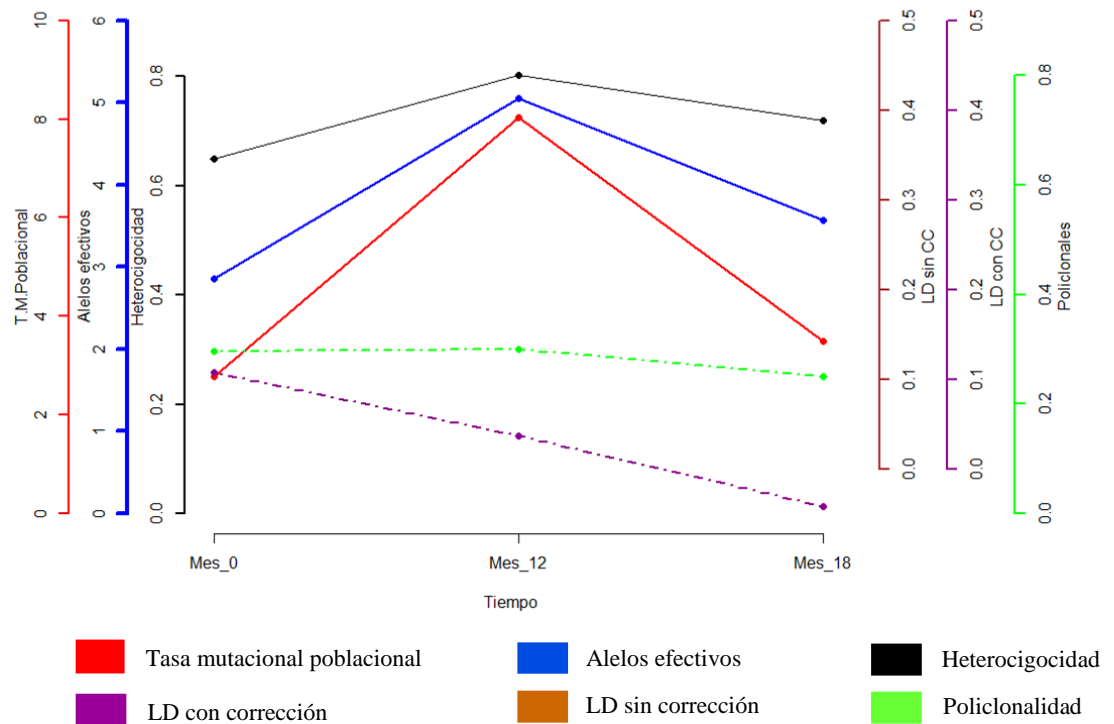


Figura 6: Análisis del efecto de la Estrategia 1 en las métricas de diversidad genética en el tiempo (Paquete poprr – Programa R)

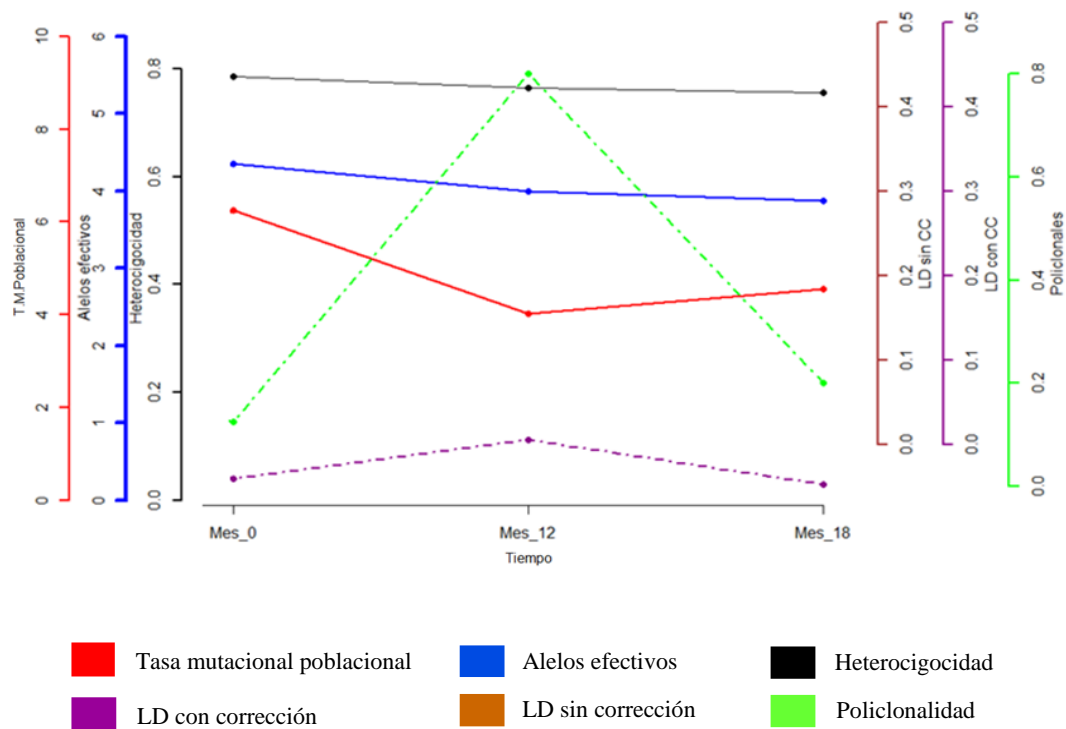


Figura 7: Análisis del efecto de la Estrategia 2 en las métricas de diversidad genética en el tiempo (Paquete poprr – Programa R)

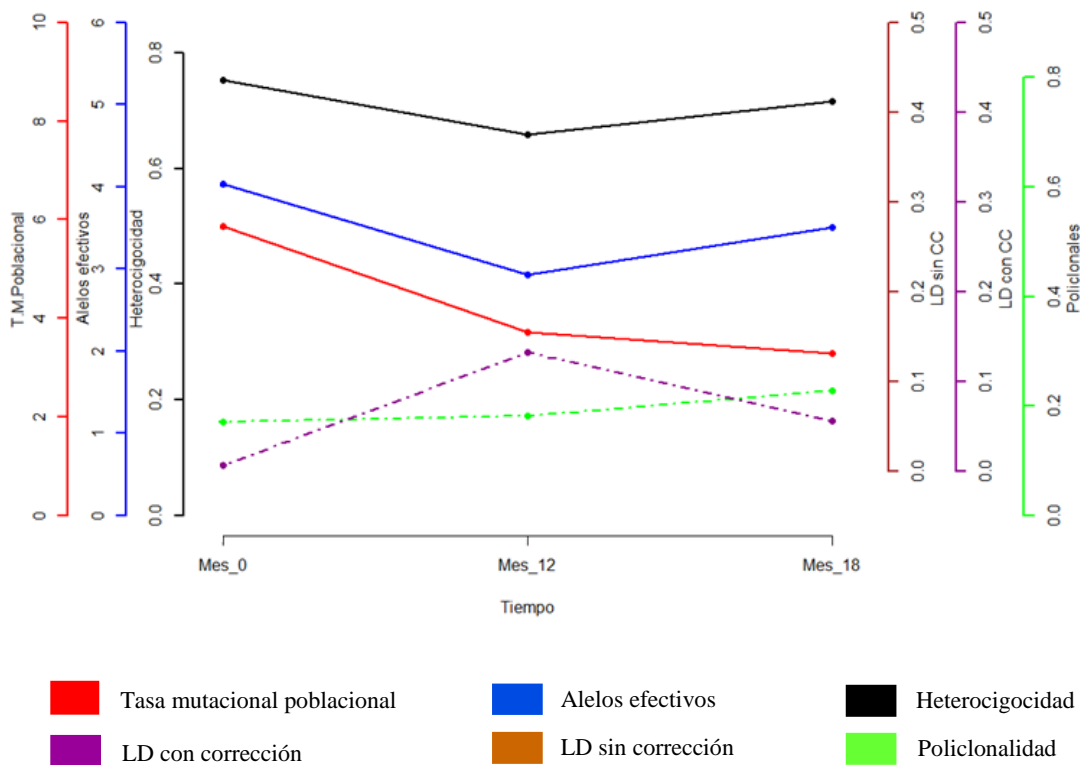


Figura 8: Análisis del efecto de la Estrategia 3 en las métricas de diversidad genética en el tiempo (Paquete poprr – Programa R)

7.4 Efecto de las estrategias de control en la reproducción de *P. vivax*

Al inicio (Mes0) de la implementación de la estrategia 1 se encontró que el 42.9% (6/14) (distancia genética de Bruvo ≤ 0.14) de haplotipos tenían una estrecha relación genética (figura 9), y en la estrategia 2 solo se encontraron haplotipos no relacionados (distancia genética de bruvo > 0.45) (figura 10). La estrategia 3 presento un menor porcentaje 24%(6/25) de haplotipos genéticamente relacionados (distancia genética de Bruvo ≤ 0.099) (figura 11). Seguidamente, durante la aplicación de las estrategias 2 y 3 (mes 12 y mes18) se encontró que solo el 18% (2/11) y 9% (2/22) de los haplotipos estaban estrechamente relacionados (distancia genética de bruvo = 0.083 y 0.146) respectivamente (figura 12 y 13). Caso contrario sucedió en la estrategia 1, debido a que ningún haplotipo estuvo genéticamente relacionado entre si (0/ 11) (figura 14).

Al realizar una comparación de la proporción de infecciones genéticamente relacionadas, al inicio y después de la implementación de las tres estrategias, solo la estrategia 1 mostró diferencias estadísticamente significativas (p-valor < 0.05) en comparación con las estrategias 2 y 3 (p-valor > 0.05) (anexo 15).

Por otro lado, análisis adicionales en la comunidad de Libertad mostraron que previo a la implementación de la estrategia 3, en la línea base del año 2015, el 49.3% (37/75) de haplotipos estuvieron genéticamente relacionados (ver anexo 16- a), cerca de 2 veces más

que al inicio y durante la implementación de la estrategia 3 en esa comunidad. Luego de su implementación en el tiempo (Mes0, Mes12 y Mes18), solo se encontró el 27.8% (5/18) de haplotipos relacionados (ver anexo 16- b). La comparación entre las proporciones de haplotipos relacionados encontrados antes y después de la implementación de la estrategia 3 en esta comunidad no fueron estadísticamente significativas ($p\text{-valor} > 0.05$) (anexo 15).

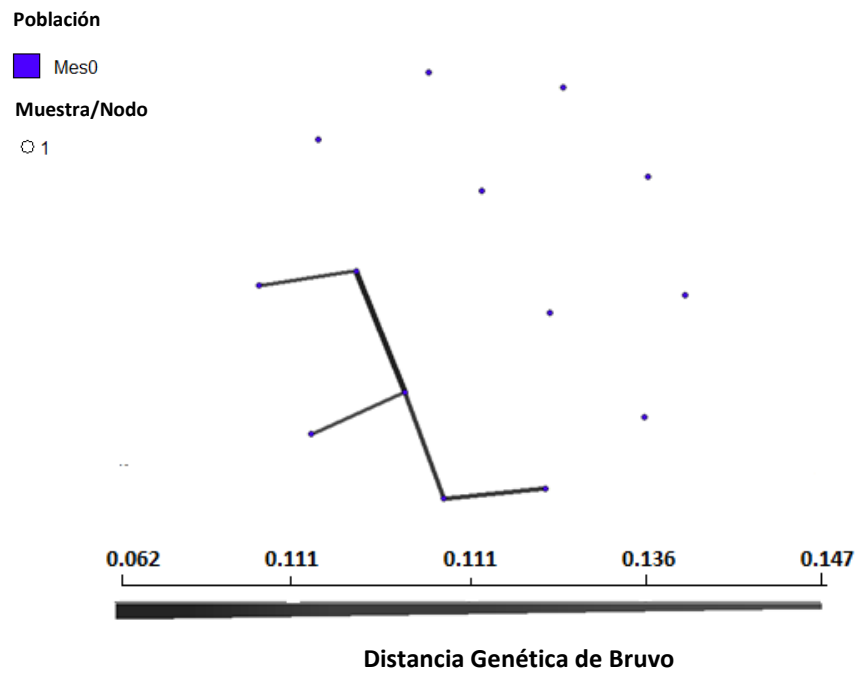


Figura 9. Análisis de Red mínima de expansión haplotípica Estrategia 1: Mes0 (Paquete poprr – Programa R)

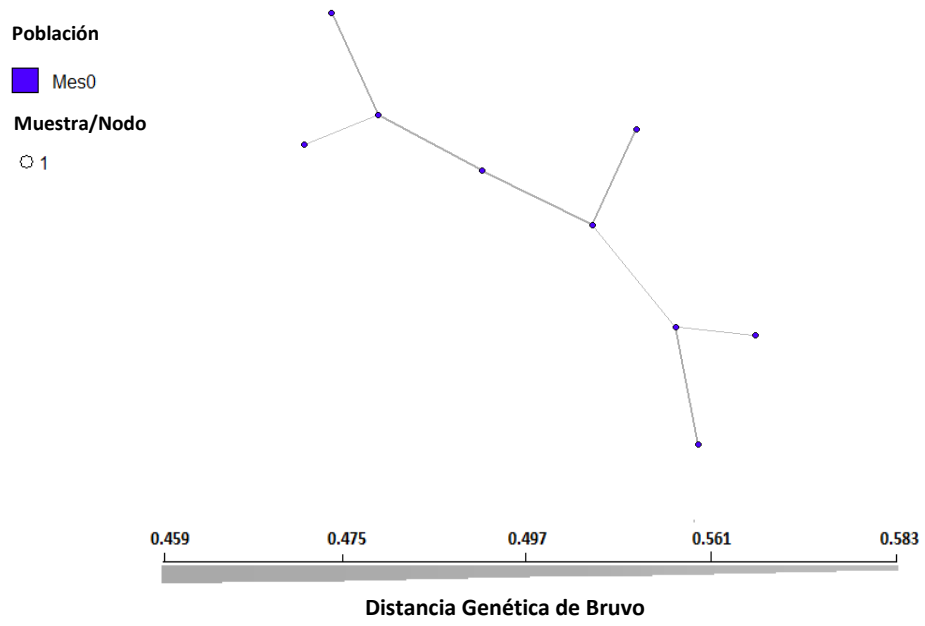


Figura 10. Análisis de Red mínima de expansión haplotípica Estrategia 2: Mes0 (Paquete poprr- Programa R)

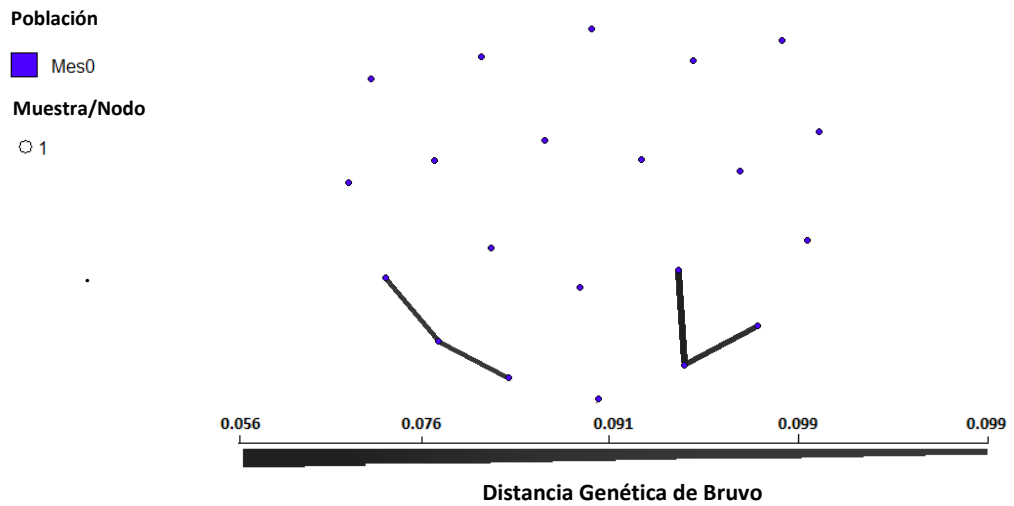


Figura 11. Análisis de Red mínima de expansión haplotípica Estrategia 3: Mes0 (Paquete poprr – Programa R)

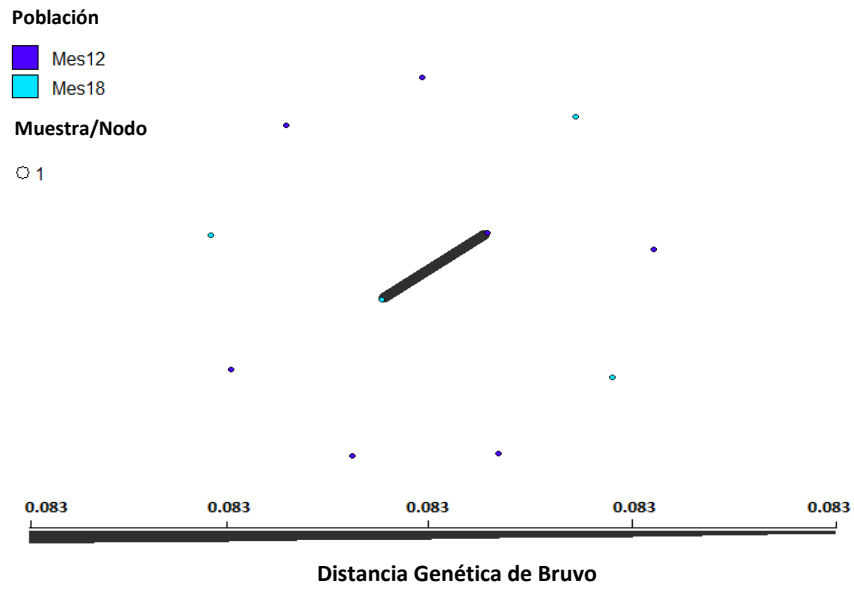


Figura 12. Análisis de Red mínima de expansión haplotípica Estrategia 2: Mes12-Mes18 (Paquete poprr – Programa R)

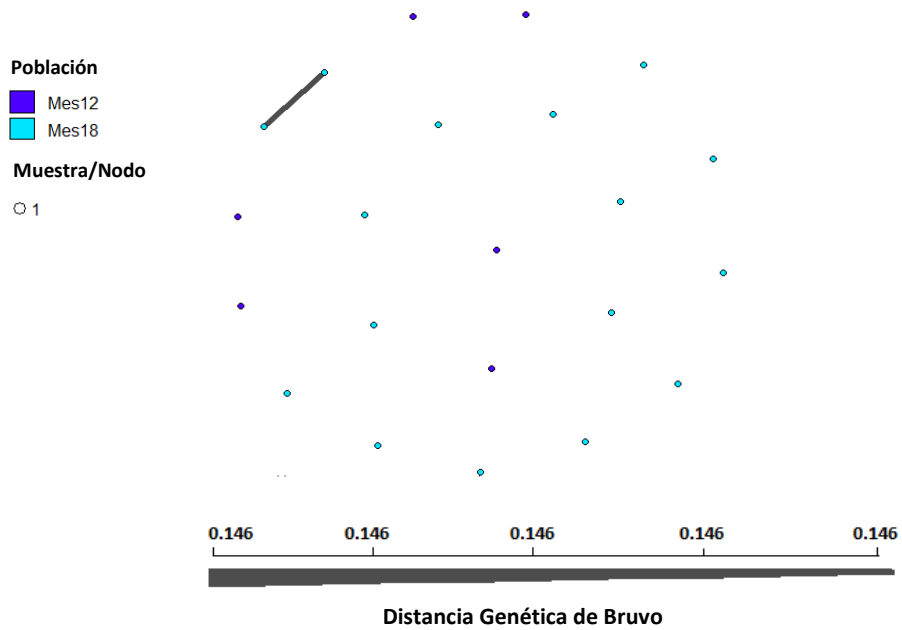


Figura 13. Análisis de Red mínima de expansión haplotípica Estrategia 3: Mes12-Mes18 (Paquete poprr – Programa R)

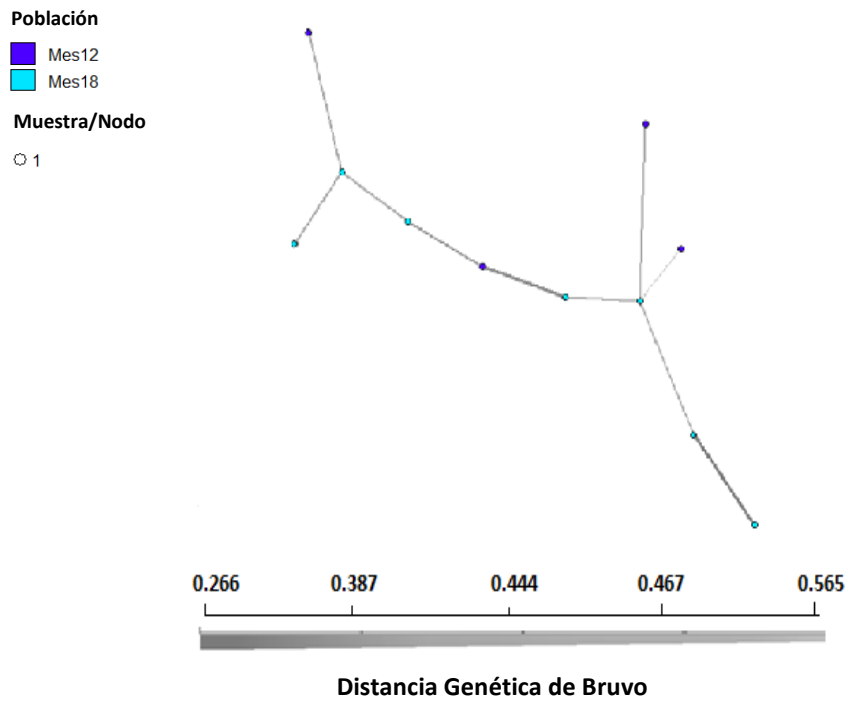


Figura 14. Análisis de Red mínima de expansión haplotípica Estrategia 1: Mes12- Mes18 (Paquete poprr – Programa R)

7.5 Efecto de las tres estrategias en las cuencas Mazan y Napo

Al inicio (mes0) y durante (mes12 y mes18) la implementación de las tres estrategias juntas, se observó en la cuenca Mazan un incremento significativo (p-valor <0.05; poder = 0.61) de la proporción de infecciones policlonales en el mes doce 42.86% (9/21) (anexo 16 y 17). Lo mismo ocurrió en la cuenca Napo, pero este incremento del 40% (4/10) no fue significativo (p-valor >0.05) (anexo 17 y 18). Se encontró en la cuenca Mazan una tendencia a mantenerse el desequilibrio de ligamiento ($I_A^S = 0.027 - 0.066$), la diversidad genética (He promedio = 0.768 ± 0.082), el número de alelos efectivos (Na.e= 4.31) y el ratio mutacional poblacional ($\theta = 7.53$) (figura 15). Algo similar se encontró en la cuenca Napo; pero en el mes18 se produjo una disminución no significativa de las métricas genético poblacional (He = 0.73 ± 0.11 , Na.e= 3.71, $\theta=4.92$, $I_A^S = 0.01 - 0.030$) (ver figura 17). Por otro lado, la comparación de las métricas genético poblaciones entre cuencas no fueron significativos (p> 0.05) (anexo 20). Los valores de las métricas genético poblacionales se encuentran en el anexo 21 y 22.

Al inicio y durante toda la implementación de las tres estrategias en la cuenca Mazan, solo se encontró 12.5%(2/16) y 6.9%(2/29) de haplotipos genéticamente relacionados, respectivamente (figura 16). Resultados similares se observaron en la cuenca Napo, con un 22.6% (7/31) y 13.3% (2/15) de haplotipos relacionados (figura 18), en

ambas cuencas la proporción de haplotipos relacionados no fueron estadísticamente significativos (ver anexo 15).

Por último, entre las dos cuencas no se encontró un exceso de heterocigotos antes y después de la implementación de las tres estrategias, sugiriendo que no hubo un reciente de cuello de botella que afecte a la población parasitaria (p-valor > 0.05) (ver anexo 23).

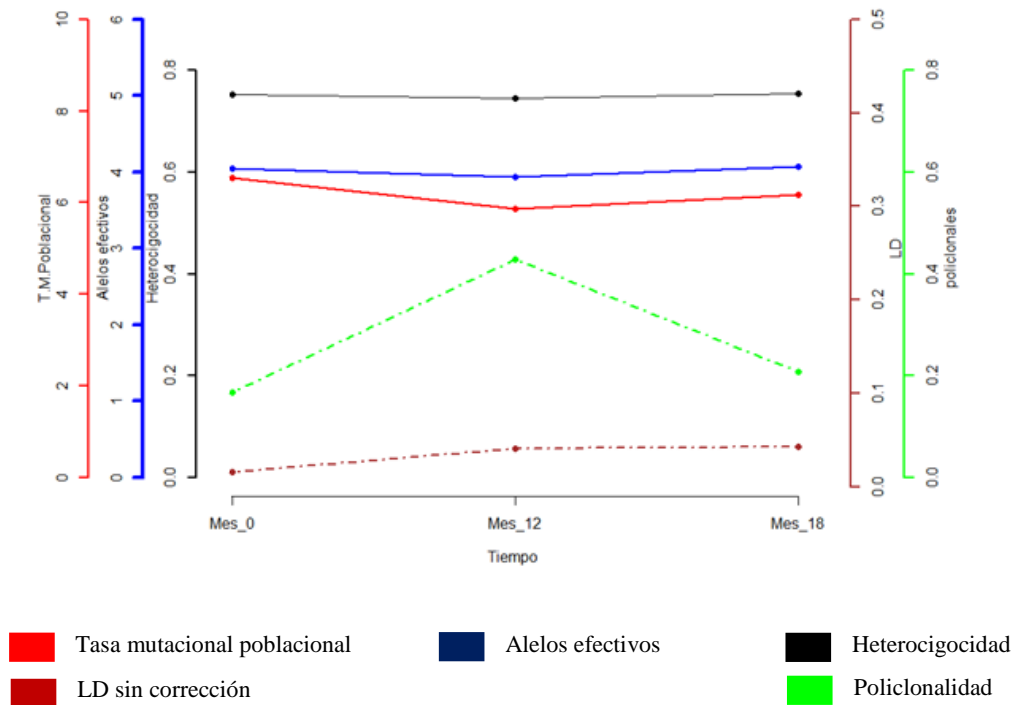


Figura 15: Análisis del efecto de las tres estrategias en las métricas de diversidad genética en la cuenca Mazan (Paquete poprr – Programa R)

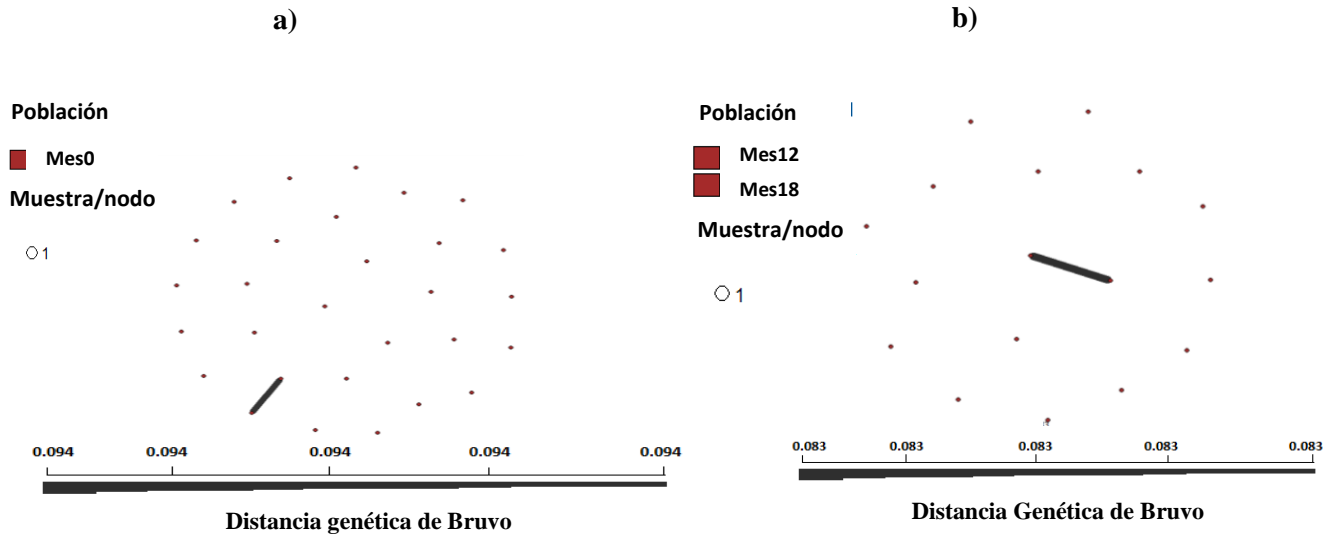


Figura 16: Análisis de Red mínima de expansión de haplotipos de *P. vivax* en la cuenca Mazan (Paquete poprr – Programa R)

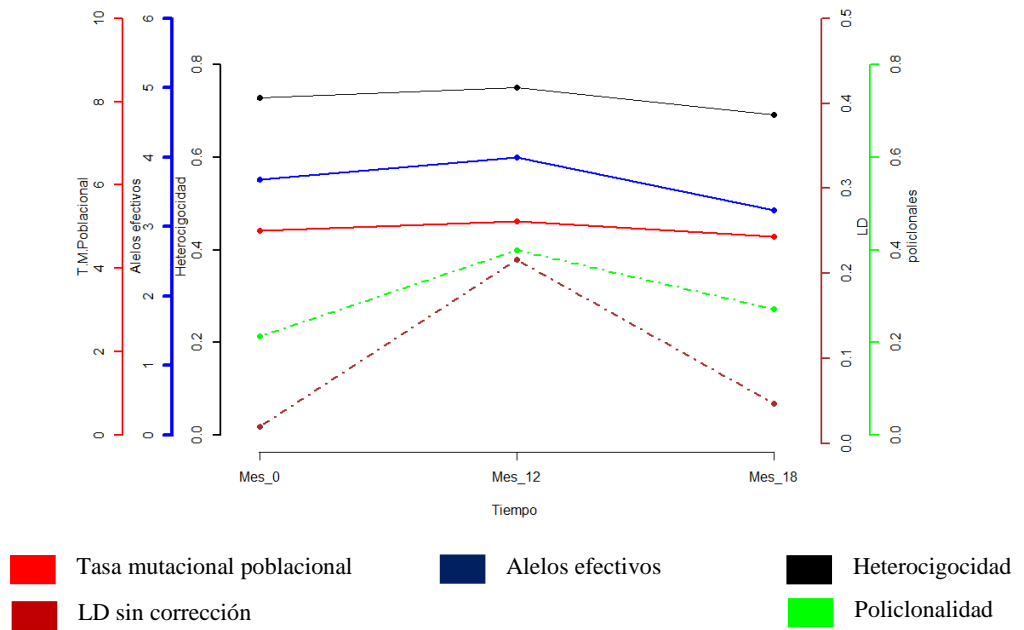


Figura 17: Análisis del efecto de las tres estrategias en las métricas de diversidad genética en la cuenca Mazan (Paquete poprr – Programa R)

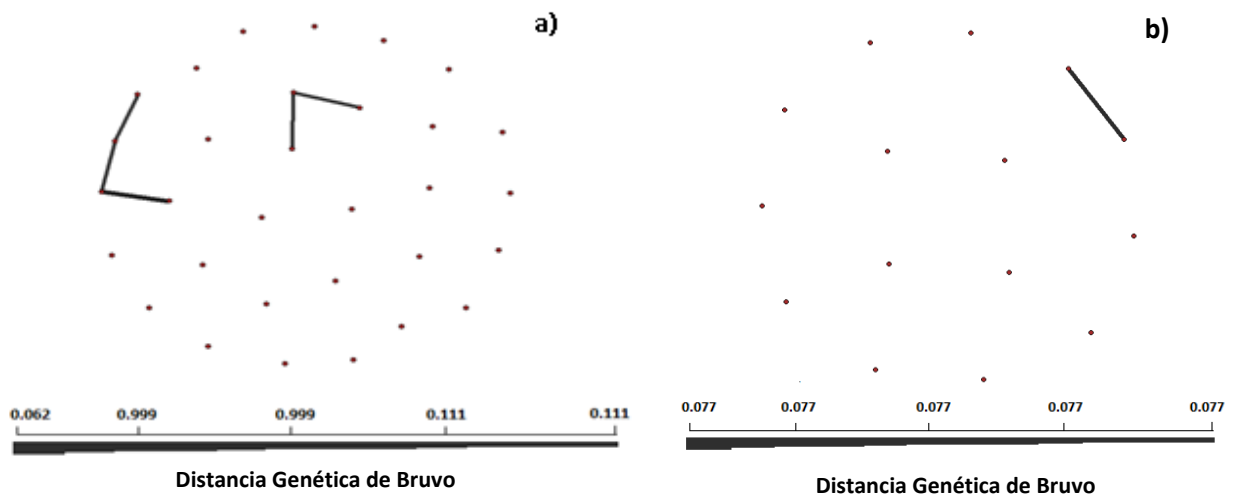


Figura 18: Análisis de Red mínima de expansión de haplotipos de *P. vivax* en la cuenca Napo (Paqee poprr- Programa R)

7.6 Infecciones recurrentes en las tres estrategias de control

Se encontraron tres individuos con infecciones recurrentes en la estrategia 3, y estos fueron encontrados en la comunidad de Libertad (anexo 24), y seis individuos con infecciones recurrentes en la estrategia 01 que provenían de las comunidades de Urco Miraño (02 individuos), Huamán Urco (02 individuos) y Primero de Enero (02 individuos) (anexo 25). Las distancias genéticas de las infecciones recurrentes en un mismo individuo en la estrategia 3 fueron mayores a 0.28; y los alelos compartidos fueron 3 en uno de los 3 individuos recurrentes y ninguna en los dos siguientes individuos (anexos 24 y 26). No se observó relación genética entre los haplotipos de estas 3 infecciones recurrentes y los haplotipos de la comunidad de Libertad del año 2015 (figura 19). Por otro lado, las infecciones recurrentes de la estrategia 1 presentaron distancias genéticas >0.29 , y menor a 0.9 respecto a la primera infección del mismo individuo, indicando que también las infecciones recurrentes fueron haplotipos distantes y compartieron menos de 4 alelos (anexo 26). Sin embargo, no se pudo demostrar si estuvieron previamente en las comunidades donde fueron detectadas, antes del inicio de la implementación de la estrategia 1.

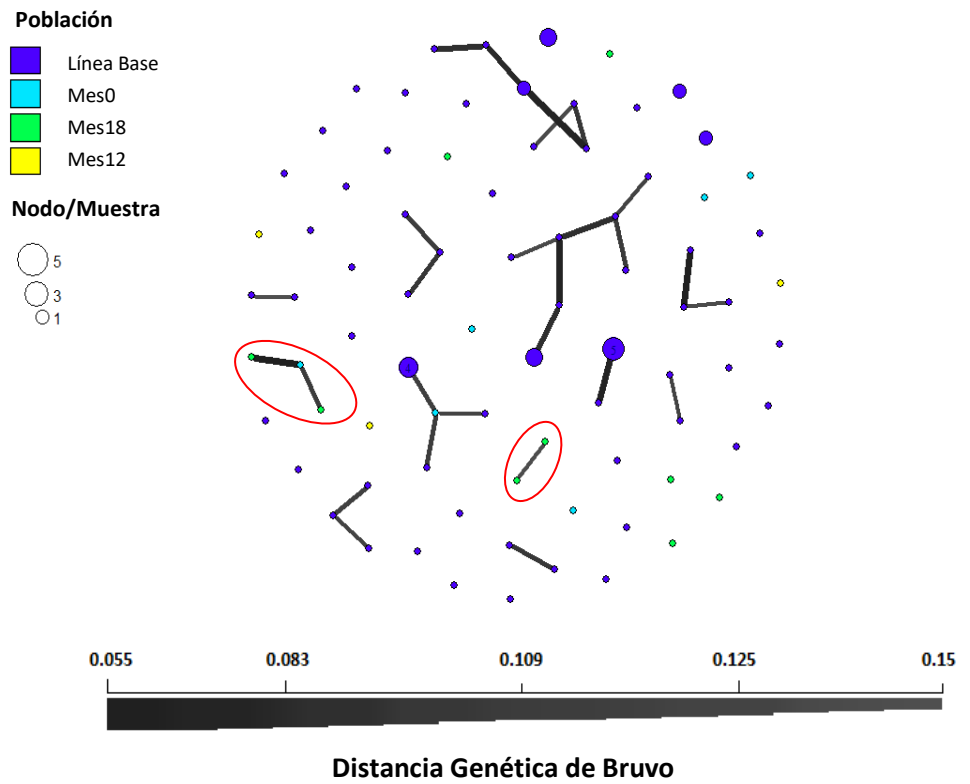


Figura 19: Análisis de Red mínima de expansión de haplotipos de *P. vivax* en la comunidad de Libertad (Paquete poprr- Programa R)

VIII. DISCUSIÓN

Pese a la disminución del número de casos a lo largo del periodo de estudio, no se observaron cambios significativos en la diversidad genética, alelos efectivos y la tasa mutacional poblacional en las estrategias, cuencas y en la comunidad de Libertad. Tampoco se observaron diferencias significativas entre estrategias en las distintas métricas genético poblacional. Estos hallazgos rechazan la hipótesis planteada en este trabajo de investigación, al no demostrar que la estrategia 03 tuvo mayor efecto en reducir la diversidad genética y reproducción de *P. vivax*. Además, estos resultados muestran que las métricas genético poblacionales no tienen una relación directa con la intensidad de transmisión. Por tanto, el cambio en las métricas genético poblacionales no solo depende de la presión ejercida por las estrategias de control, sino también de otros factores que contribuyen a la variabilidad de la población parasitaria, como por ejemplo la importación continua de los parásitos y la reactivación de hipnozoitos.

Los resultados de este trabajo permitieron evidenciar la disminución de los casos locales de Malaria causada por *P. vivax*. Sin embargo, no se observó la reducción de la diversidad genética de la población parasitaria, ni la disminución de la proporción de infecciones policlonales. Estos resultados tienen una implicancia en la transmisión y la población del parásito, debido a que esta alta diversidad le otorga una buena capacidad de adaptación y supervivencia a su medio local facilitando su transmisión. Asimismo, hace evidente que las estrategias

evaluadas no están considerando otros factores de riesgo como, por ejemplo, la población que tiene alta movilidad local, siendo capaces de importar o introducir nuevos parásitos, y como consecuencia estos parásitos pueden explicar la persistencia de una alta diversidad genética. Otro aspecto que no se ha considerado dentro de las tres estrategias es el control de los mosquitos, responsable de la transmisión de los parásitos.

Nuestros resultados no muestran efectos negativos en la población parasitaria debido a que no hubieron cambios significativos en la diversidad genética (0.649 -0.802), la tasa mutacional poblacional (4.39 – 7.65) e infecciones policlonales (36%), estos resultados concuerdan con Noor Rain *et al* 2013, quienes encontraron una moderada a alta diversidad genética (0.583 – 0.825) y una modesta proporción de infecciones policlonales (17 – 30%) luego de aplicar las estrategias de detección pasiva y activa en Malasia (113). Pese a que los escenarios epidemiológicos y la tasa de picadura infectiva del mosquito son similares, ambos estudios sugieren que estas dos estrategias presentan limitaciones al no tener una buena cobertura sobre todas las infecciones, como por ejemplo las infecciones submicroscópicas, que no pueden ser detectados por la microscopia, y esto permite que los parásitos sub-microscópicos sean la fuente de la malaria residual local que propician el constante resurgimiento de la malaria. Por lo tanto, se deben implementar otras estrategias con métodos de diagnóstico más sensibles como por ejemplo la

amplificación isotérmica mediado por horquilla (LAMP por sus siglas en inglés), la cual es una técnica molecular que se usa en campo y presenta una sensibilidad igual o mayor al PCR en tiempo real.

Resultados similares a este estudio fueron reportados por Gunawardena *et al* 2014 en Sri Lanka, donde la aplicación de detección activa y pasiva de casos no causó efectos negativos en la población del parásito (114). En este estudio tampoco se encontraron recientes cuellos de botellas al inicio y durante la aplicación de cada estrategia de control, evidenciando la dificultad que tienen estas estrategias para reducir la diversidad genética y las infecciones policlonales permitiendo al parásito sobrevivir a los diferentes cambios ambientales. Por lo tanto, es de gran importancia implementar nuevas estrategias de control, pero con mayor continuidad en el tiempo para poder lograr disminuir la diversidad genética y las infecciones policlonales.

Por otro lado, Lo *et al* 2015 si lograron encontrar un reciente cuello de botella y una reducción de la diversidad genética en la población de parásito entre la frontera Myanmar y China, esto como consecuencia del uso integrado de la vigilancia pasiva, y el control vectorial (fumigaciones intradomiciliarias), en los centros de refugios de personas desplazadas internamente (115), sugiriendo que las estrategias de control combinadas y sostenibles en el tiempo pueden tener efecto. Una posible explicación, para este trabajo, a la ausencia

de un cuello de botella es la presencia de infecciones importadas, y esto explicaría el déficit de heterocigocidad observada. Previamente esta área endémica ha sido caracterizada como altamente vulnerable a la importación e introducción de infecciones (63), y la población se caracteriza por su alta movilidad (116). Esta vulnerabilidad podría explicar la poca relación genética entre haplotipos, los cambios continuos en el tiempo, y las diferencias de haplotipos en individuos con infecciones recurrentes, lo que puede permitir el resurgimiento de los casos de malaria a nivel local.

El movimiento poblacional entre las comunidades de la cuenca Napo y Mazan es alto (2 viajes promedio por mes), y se promueve mayoritariamente por motivos recreacionales (36%), actividades ocupacionales (21%), y la interconexión de comunidades a través del río Mazan (116). Un enfoque comunidad específica en las cuencas Mazan y Napo, mostró que factores de riesgo como ocupación y viaje en el último mes, están asociados a alta prevalencia parasitaria (6). Análisis genéticos poblacionales confirmaron que 20 infecciones fueron producidas por importación o introducción, producto del movimiento humano entre estas mismas cuencas (63). El movimiento poblacional también es favorecido por las condiciones económicas-geográficas de su principal fuente de acceso a través del río Mazan (117). Por tanto, el movimiento humano y las condiciones geográficas, así como el crecimiento del caudal del río Mazan, a lo largo de las

comunidades asentadas en la trayectoria de esta, promueven la interconexión entre comunidades y el flujo genético del parásito.

La activación de los hipzonoitos también puede explicar las recurrencias de las infecciones y mantener la diversidad genética alta dentro de las comunidades. Por ejemplo, en cepas de regiones tropicales presentan múltiples relapsos con cortos periodos de latencia (3-5 semanas), el cual podría ser el caso del escenario Amazónico. Estudios de genotipificación en Brasil, Asia y Papua Nueva Guinea (60,62,64), demostraron que las reactivaciones de los hipozoitos son producidas por cepas heterólogas, es decir que la segunda infección es producida por clones genéticamente diferentes a la primera infección aguda.

Por otro lado, los datos presentados aquí muestran que el poco flujo genético encontrado no causó efectos colaterales entre estrategias con cercanías geográficas. No obstante, no se descarta el flujo genético con otras áreas geográficas no analizadas en este estudio, lo cual sería una explicación de que los haplotipos no estuvieron relacionados genéticamente con previas infecciones.

El tamaño de muestra es una limitación para que no se haya podido encontrar un efecto significativo en la reducción de la diversidad genética, infecciones policlonales y alelos efectivos. Por ejemplo, las estrategias 01 y 02 tuvieron solo 4 muestras en el mes 12 y 18 respectivamente y se observa una sobre representación de la diversidad

genética, y tasa mutacional poblacional (θ). Lo mismo se observó en la cuenca Napo y la comunidad Libertad que tuvieron solo cuatro y tres muestras en el mes doce respectivamente, y esto pudo haber ocasionado una sub representación de la diversidad genética, el desequilibrio de ligamiento y el aumento de la tasa mutacional poblacional. Otra limitación de este trabajo, que dificultó observar el efecto de las 3 estrategias en las métricas de diversidad genética, es el 40% (237) de las muestras que no pudieron ser genotipificadas debido a que presentaron bajas densidades parasitarias (≤ 3 parasitos/ μ l). Esta baja parasitemia caracteriza las infecciones causadas por *Plasmodium vivax* en esta región. Pese a que la estrategia 03 pudo detectar las infecciones; sin embargo, no se pudieron genotipificar un gran número de estas muestras.

Por último, la conservación y calidad de las muestras juegan un rol clave para este tipo de trabajo, debido a que el ADN se pudo haber degradado durante el tiempo de almacenamiento. Conservar el ADN a -20 °C tal vez no sea suficiente para evitar su degradación, sería aconsejable al momento de tomar la muestra de sangre, que se realice de manera inmediata la genotipificación para evitar estos inconvenientes.

Es necesario seguir desarrollando nuevas estrategias de control pero que focalicen a un grupo de riesgo como las personas que se movilizan mucho por actividades específicas, y que pueden transmitir y expandir

la malaria. También, es necesario que se siga mejorando las estrategias evaluadas en este estudio y se complementen con estrategias basadas en el control del vector, para que de esta manera la integración de ambas tenga efectos sinérgicos negativos sobre las poblaciones parasitarias, y de esta forma se pueda observar el efecto a corto o mediano plazo, y por tanto se pueda eliminar y erradicar la malaria en el Perú.

IX. CONCLUSIONES

- Para este estudio, al inicio de la implementación de las tres estrategias, el bajo flujo genético encontrado entre las poblaciones parasitarias, no fue estadísticamente significativa para causar efectos colaterales entre estrategias con cercanías geográficas, es decir que cada estrategia tuvo suficiente cobertura sobre su foco de transmisión.
- Al inicio y durante la implementación entre y dentro de cada estrategia de control, no se observaron cambios estadísticamente significativos en las métricas de diversidad genética a través del tiempo, esto debido a la vulnerabilidad de las zonas al ingreso de parásitos y la biología propia de *P. vivax* de causar los relapsos del tipo heterólogos que permiten el mantenimiento de la diversidad genética y el peligro de resurgimiento de la malaria a través del tiempo.
- Al inicio y durante la implementación de las tres estrategias de control no se observó un reciente cuello botella sobre la población del parásito, esto probablemente por la importación e introducción de nuevos parásitos, por grupos de riesgos que no están siendo considerados por las estrategias de control evaluadas en este estudio.

- La estrategia 1 produjo una reducción significativa de los haplotipos genéticamente relacionados a través del tiempo, debido a que esta estrategia permite tratar toda la población de parásitos que causan infecciones sintomáticas.

X. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

- La pérdida de muestra debido a las bajas densidades parasitarias de las infecciones causadas por *P. vivax*.
- El tiempo de conservación de las muestras produjo una degradación del material genético, esto disminuyó la eficiencia de la genotipificación.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OMS | Informe mundial sobre el paludismo 2018 [Internet]. WHO. [citado 7 de agosto de 2019]. Disponible en: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/report/es/>
2. Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades (2019). Ministerio de Salud. Boletín Epidemiológico Semana 42. p. 14.
3. WHO | Disease surveillance for malaria elimination: operational manual (archived) [Internet]. WHO. [citado 7 de agosto de 2019]. Disponible en: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241503334/en/>
4. Moonen B, Cohen JM, Snow RW, Slutsker L, Drakeley C, Smith DL, et al. Operational strategies to achieve and maintain malaria elimination. *Lancet Lond Engl*. 6 de noviembre de 2010;376(9752):1592-603.
5. Dirección General de Epidemiología (2006). Ministerio de Salud. Protocolos de vigilancias epidemiológica parte 1. Lima - Perú p. 7.
6. Carrasco-Escobar G, Gamboa D, Castro MC, Bangdiwala SI, Rodriguez H, Contreras-Mancilla J, et al. Micro-epidemiology and spatial heterogeneity of *P. vivax* parasitaemia in riverine communities of the Peruvian Amazon: A multilevel analysis. *Sci Rep*. 14 de agosto de 2017;7(1):1-17.
7. Fontoura PS, Finco BF, Lima NF, Jr JF de C, Vinetz JM, Castro MC, et al. Reactive Case Detection for *Plasmodium vivax* Malaria Elimination in Rural Amazonia. *PLoS Negl Trop Dis*. 12 de diciembre de 2016;10(12):e0005221.
8. Roshanravan B, Kari E, Gilman RH, Cabrera L, Lee E, Metcalfe J, et al. Endemic malaria in the Peruvian Amazon region of Iquitos. *Am J Trop Med Hyg*. julio de 2003;69(1):45-52.
9. NOTI SERIES. Sala de Situación de la Vigilancia epidemiológica de Malaria. Loreto. dirección web en https://www.dge.gob.pe/salasisituacional/sala/index/SALA_VIGILA/141. [Internet]. Tableau Software. [citado 31 de octubre de 2019]. Disponible en: https://public.tableau.com/views/NOTISERIES_15580211651890/SALA_VIGILA?:embed=y&:showVizHome=no&:host_url=https%3A%2F%2Fpublic.tableau.com%2F&:embed_code_version=3&:tabs=no&:toolbar=yes&:animate_transition=yes&:display_static_image=no&:display_spinner=no&:display_overlay=yes&:display_count=yes&:loadOrderID=0
10. Rosas-Aguirre A, Gamboa D, Manrique P, Conn JE, Moreno M, Lescano AG, et al. Epidemiology of *Plasmodium vivax* Malaria in Peru. *Am J Trop Med Hyg*. 28 de diciembre de 2016;95(6 Suppl):133-44.

11. Roper MH, Torres RS, Goicochea CG, Andersen EM, Guarda JS, Calampa C, et al. The epidemiology of malaria in an epidemic area of the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* febrero de 2000;62(2):247-56.
12. Bhatt S, Weiss DJ, Cameron E, Bisanzio D, Mappin B, Dalrymple U, et al. The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature.* 8 de octubre de 2015;526(7572):207-11.
13. Barry AE, Waltmann A, Koepfli C, Barnadas C, Mueller I. Uncovering the transmission dynamics of *Plasmodium vivax* using population genetics. *Pathog Glob Health.* mayo de 2015;109(3):142-52.
14. Tibayrenc M, Ayala FJ. New insights into clonality and panmixia in *Plasmodium* and *Toxoplasma*. *Adv Parasitol.* 2014;84:253-68.
15. 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.* 2 de septiembre de 2015;93(3 Suppl):79-86.
16. User S, <https://www.facebook.com/pahowho>. PAHO/WHO | Aumentan los casos de malaria en las Américas [Internet]. Pan American Health Organization / World Health Organization. 2018 [citado 7 de agosto de 2019]. Disponible en: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=14080:aumentan-los-casos-de-malaria-en-las-americas&Itemid=1926&lang=en
17. Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades - Ministerio de Salud (MINSA). Semana 28 - Octubre 2019. p. 4 - 7.
18. Parker BS, Paredes Olortegui M, Peñataro Yori P, Escobedo K, Florin D, Rengifo Pinedo S, et al. Hyperendemic malaria transmission in areas of occupation-related travel in the Peruvian Amazon. *Malar J.* 31 de mayo de 2013;12:178.
19. Roper MH, Torres RS, Goicochea CG, Andersen EM, Guarda JS, Calampa C, et al. The epidemiology of malaria in an epidemic area of the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* febrero de 2000;62(2):247-56.
20. Rosas-Aguirre A, Guzman-Guzman M, Gamboa D, Chuquiayauri R, Ramirez R, Manrique P, et al. Micro-heterogeneity of malaria transmission in the Peruvian Amazon: a baseline assessment underlying a population-based cohort study. *Malar J.* 04 de 2017;16(1):312.
21. Soto-Calle V, Rosas-Aguirre A, Llanos-Cuentas A, Abatih E, DeDeken R, Rodriguez H, et al. Spatio-temporal analysis of malaria incidence in the Peruvian Amazon Region between 2002 and 2013. *Sci Rep.* 16 de 2017;7:40350.

22. Bousema T, Griffin JT, Sauerwein RW, Smith DL, Churcher TS, Takken W, et al. Hitting Hotspots: Spatial Targeting of Malaria for Control and Elimination. *PLOS Med.* 31 de enero de 2012;9(1):e1001165.
23. Rosas-Aguirre A, Speybroeck N, Llanos-Cuentas A, Rosanas-Urgell A, Carrasco-Escobar G, Rodriguez H, et al. Hotspots of Malaria Transmission in the Peruvian Amazon: Rapid Assessment through a Parasitological and Serological Survey. *PLoS ONE* [Internet]. 10 de septiembre de 2015 [citado 7 de agosto de 2019];10(9). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4565712/>
24. Mosha JF, Sturrock HJW, Greenhouse B, Greenwood B, Sutherland CJ, Gadalla N, et al. Epidemiology of subpatent *Plasmodium falciparum* infection: implications for detection of hotspots with imperfect diagnostics. *Malar J.* 1 de julio de 2013;12:221.
25. Chuquiyaauri 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.* marzo de 2012;121(3):292-302.
26. Staedke SG, Nottingham EW, Cox J, Kanya MR, Rosenthal PJ, Dorsey G. Short report: proximity to mosquito breeding sites as a risk factor for clinical malaria episodes in an urban cohort of Ugandan children. *Am J Trop Med Hyg.* septiembre de 2003;69(3):244-6.
27. ASALE R-. «Diccionario de la lengua española» - Edición del Tricentenario [Internet]. «Diccionario de la lengua española» - Edición del Tricentenario. [citado 7 de agosto de 2019]. Disponible en: <https://dle.rae.es/>
28. WHO | Malaria [Internet]. WHO. [citado 7 de agosto de 2019]. Disponible en: <https://www.who.int/ith/diseases/malaria/en/>
29. WHO malaria terminology. :38.
30. Arieu F, Gay F, Ménard R, editores. *Malaria Control and Elimination* [Internet]. Humana Press; 2019 [citado 7 de agosto de 2019]. (Methods in Molecular Biology). Disponible en: <https://www.springer.com/gp/book/9781493995493>
31. Wickremasinghe R, Fernando SD, Thillekaratne J, Wijeyaratne PM, Wickremasinghe AR. Importance of active case detection in a malaria elimination programme. *Malar J.* 23 de mayo de 2014;13(1):186.
32. Utarini A, Chandramohan D, Nyström L. Comparison of active and passive case detection systems in Jepara District, Indonesia. *Asia Pac J Public Health.* 2007;19(1):14-7.

33. Singh N, Bharti PK, Kumre NS. Active v. passive surveillance for malaria in remote tribal belt of Central India: Implications for malaria elimination. *Pathog Glob Health*. junio de 2016;110(4-5):178-84.
34. Branch O, Casapia WM, Gamboa DV, Hernandez JN, Alava FF, Roncal N, et al. Clustered local transmission and asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria infections in a recently emerged, hypoendemic Peruvian Amazon community. *Malar J*. 23 de junio de 2005;4:27.
35. Polymerase Chain Reaction (PCR) [Internet]. [citado 7 de agosto de 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpct/>
36. Pöschl B, Waneesorn J, Thekisoe O, Chutipongvivate S, Karanis P, Panagiotis K. Comparative diagnosis of malaria infections by microscopy, nested PCR, and LAMP in northern Thailand. *Am J Trop Med Hyg*. julio de 2010;83(1):56-60.
37. Rantala A-M, Taylor SM, Trotman PA, Luntamo M, Mbewe B, Maleta K, et al. Comparison of real-time PCR and microscopy for malaria parasite detection in Malawian pregnant women. *Malar J*. 6 de octubre de 2010;9:269.
38. Ponce C, Kaczorowski F, Perpoint T, Mialhes P, Sigal A, Javouhey E, et al. Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for screening patients with imported malaria in a non-endemic setting. *Parasite Paris Fr*. 2017;24:53.
39. Njiru ZK. Loop-mediated isothermal amplification technology: towards point of care diagnostics. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(6):e1572.
40. Serra-Casas E, Manrique P, Ding XC, Carrasco-Escobar G, Alava F, Gave A, et al. Loop-mediated isothermal DNA amplification for asymptomatic malaria detection in challenging field settings: Technical performance and pilot implementation in the Peruvian Amazon. *PloS One*. 2017;12(10):e0185742.
41. 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*. mayo de 2005;43(5):2435-40.
42. Smith Gueye C, Newby G, Gosling RD, Whittaker MA, Chandramohan D, Slutsker L, et al. Strategies and approaches to vector control in nine malaria-eliminating countries: a cross-case study analysis. *Malar J*. 4 de enero de 2016;15:2.
43. Takken W, Knols BGJ. Malaria vector control: current and future strategies. *Trends Parasitol*. marzo de 2009;25(3):101-4.
44. 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.* 30 de julio de 2015;14(1):290.

45. Institute of Medicine (US) Committee on the Economics of Antimalarial Drugs. *Saving Lives, Buying Time: Economics of Malaria Drugs in an Age of Resistance* [Internet]. Arrow KJ, Panosian C, Gelband H, editores. Washington (DC): National Academies Press (US); 2004 [citado 7 de agosto de 2019]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK215624/>

46. Enger A, Strand ØA, Ranheim T, Hellum KB. Exflagellation of microgametocytes in *Plasmodium vivax* malaria: a diagnostic conundrum. *Med Princ Pract Int J Kuwait Univ Health Sci Cent.* octubre de 2004;13(5):298-300.

47. Aly ASI, Vaughan AM, Kappe SHI. Malaria parasite development in the mosquito and infection of the mammalian host. *Annu Rev Microbiol.* 2009;63:195-221.

48. Bousema T, Drakeley C. Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination. *Clin Microbiol Rev.* abril de 2011;24(2):377-410.

49. Hulden L, Hulden L. Activation of the hypnozoite: a part of *Plasmodium vivax* life cycle and survival. *Malar J.* 16 de abril de 2011;10:90.

50. White NJ. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J.* 11 de octubre de 2011;10(1):297.

51. Arnott A, Barry AE, Reeder JC. Understanding the population genetics of *Plasmodium vivax* is essential for malaria control and elimination. *Malar J.* 10 de enero de 2012;11:14.

52. Barry AE, Waltmann A, Koepfli C, Barnadas C, Mueller I. Uncovering the transmission dynamics of *Plasmodium vivax* using population genetics. *Pathog Glob Health.* mayo de 2015;109(3):142-52.

53. Lin JT, Saunders DL, Meshnick SR. The role of submicroscopic malaria in malaria transmission: what is the evidence? *Trends Parasitol.* abril de 2014;30(4):183-90.

54. Rovira-Vallbona E, Contreras-Mancilla JJ, Ramirez R, Guzmán-Guzmán M, Carrasco-Escobar G, Llanos-Cuentas A, et al. Predominance of asymptomatic and sub-microscopic infections characterizes the *Plasmodium* gametocyte reservoir in the Peruvian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis.* 3 de julio de 2017;11(7):e0005674.

55. Carrasco-Escobar G, Miranda-Alban J, Fernandez-Miñope C, Brouwer KC, Torres K, Calderon M, et al. High prevalence of very-low *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* parasitaemia carriers in the Peruvian Amazon: insights into local and occupational mobility-related transmission.

- Malar J [Internet]. 16 de octubre de 2017 [citado 7 de agosto de 2019];16. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5644076/>
56. Lindblade KA, Steinhardt L, Samuels A, Kachur SP, Slutsker L. The silent threat: asymptomatic parasitemia and malaria transmission. *Expert Rev Anti Infect Ther.* junio de 2013;11(6):623-39.
57. Laishram DD, Sutton PL, Nanda N, Sharma VL, Sobti RC, Carlton JM, et al. The complexities of malaria disease manifestations with a focus on asymptomatic malaria. *Malar J.* 31 de enero de 2012;11(1):29.
58. Oakley MS, Gerald N, McCutchan TF, Aravind L, Kumar S. Clinical and molecular aspects of malaria fever. *Trends Parasitol.* octubre de 2011;27(10):442-9.
59. McKenzie FE, Jeffery GM, Collins WE. *Plasmodium vivax* blood-stage dynamics. *J Parasitol.* junio de 2002;88(3):521-35.
60. Araujo FCF de, Rezende AM de, Fontes CJF, Carvalho LH, Brito CFA de. Multiple-Clone Activation of Hypnozoites Is the Leading Cause of Relapse in *Plasmodium vivax* Infection. *PLOS ONE.* 21 de noviembre de 2012;7(11):e49871.
61. Delgado-Ratto C, Soto-Calle VE, Van den Eede P, Gamboa D, Rosas A, Abatih EN, et al. Population structure and spatio-temporal transmission dynamics of *Plasmodium vivax* after radical cure treatment in a rural village of the Peruvian Amazon. *Malar J.* 6 de enero de 2014;13(1):8.
62. Imwong M, Snounou G, Pukrittayakamee S, Tanomsing N, Kim JR, Nandy A, et al. Relapses of *Plasmodium vivax* infection usually result from activation of heterologous hypnozoites. *J Infect Dis.* 1 de abril de 2007;195(7):927-33.
63. Manrique Valverde Paulo. *Epidemiologia Molecular de Plasmodium vivax en 04 Comunidades Rivereñas del Distrito de Mazan en la Amazonia Peruana.* Mayo 2018. p. 90.
64. Betuela I, Rosanas-Urgell A, Kiniboro B, Stanisic DI, Samol L, de Lazzari E, et al. Relapses contribute significantly to the risk of *Plasmodium vivax* infection and disease in Papua New Guinean children 1-5 years of age. *J Infect Dis.* 1 de diciembre de 2012;206(11):1771-80.
65. A Likelihood Approach to Estimate the Number of Co-Infections [Internet]. [citado 5 de octubre de 2019]. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0097899>
66. Superinfection in malaria: *Plasmodium* shows its iron will [Internet]. [citado 5 de octubre de 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3245699/>

67. 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.* septiembre de 2015;93(3 Suppl):79-86.
68. Hartl Daniel and Clarl Andrew. *Principles of Population Genetics*. Fourth Edition. p. 652.
69. Lande R, Shannon S. THE ROLE OF GENETIC VARIATION IN ADAPTATION AND POPULATION PERSISTENCE IN A CHANGING ENVIRONMENT. *Evol Int J Org Evol.* febrero de 1996;50(1):434-7.
70. *Principles of Population Genetics - Hardcover - Daniel L. Hartl; Andrew G. Clark - Oxford University Press [Internet]*. [citado 10 de agosto de 2019]. Disponible en: <https://global.oup.com/ushe/product/principles-of-population-genetics-9780878933082?cc=us&lang=en&>
71. Matthew Hamilton. *Population Genetics 2009*. Editorial Wiley-Blackwell. p. 406.
72. Bengtsson BO. Genetic variation in organisms with sexual and asexual reproduction. *J Evol Biol.* 2003;16(2):189-99.
73. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics.* julio de 1978;89(3):583-90.
74. Anmarkrud JA, Kleven O, Bachmann L, Lifjeld JT. Microsatellite evolution: Mutations, sequence variation, and homoplasy in the hypervariable avian microsatellite locus HrU10. *BMC Evol Biol.* 9 de mayo de 2008;8(1):138.
75. Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press; 2010. 643 p.
76. Brown AH, Feldman MW, Nevo E. Multilocus Structure of Natural Populations of *HORDEUM SPONTANEUM*. *Genetics.* octubre de 1980;96(2):523-36.
77. Slatkin M. Linkage disequilibrium — understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nat Rev Genet.* junio de 2008;9(6):477-85.
78. *Population Genetics (2009)*. Matthew B. Hamilton. Editorial Wiley-Blackwell. p. 422.
79. Piry S, Luikart G, Cornuet J-M. Computer note. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data. *J Hered.* 1 de julio de 1999;90(4):502-3.

80. Peery MZ, Kirby R, Reid BN, Stoelting R, Doucet-B eer E, Robinson S, et al. Reliability of genetic bottleneck tests for detecting recent population declines. *Mol Ecol.* julio de 2012;21(14):3403-18.
81. Wang J. On the measurements of genetic differentiation among populations. *Genet Res.* octubre de 2012;94(5):275-89.
82. Jost L. GST and its relatives do not measure differentiation. *Mol Ecol.* 2008;17(18):4015-26.
83. Meirmans PG, Hedrick PW. Assessing population structure: FST and related measures. *Mol Ecol Resour.* 2011;11(1):5-18.
84. Wright S. *Evolution and the Genetics of Populations, Volume 4: Variability Within and Among Natural Populations.* University of Chicago Press; 1984. 590 p.
85. Meirmans PG. Using the Amova Framework to Estimate a Standardized Genetic Differentiation Measure. *Evolution.* 2006;60(11):2399-402.
86. Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics.* junio de 1992;131(2):479-91.
87. Vieira MLC, Santini L, Diniz AL, Munhoz C de F. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genet Mol Biol.* 2016;39(3):312-28.
88. Li Y-C, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol Ecol.* 2002;11(12):2453-65.
89. Gunawardena S, Karunaweera ND, Ferreira MU, Phone-Kyaw M, Pollack RJ, Alifrangis M, et al. Geographic structure of *Plasmodium vivax*: microsatellite analysis of parasite populations from Sri Lanka, Myanmar, and Ethiopia. *Am J Trop Med Hyg.* febrero de 2010;82(2):235-42.
90. Koepfli C, Timinao L, Antao T, Barry AE, Siba P, Mueller I, et al. A Large *Plasmodium vivax* Reservoir and Little Population Structure in the South Pacific. *PLOS ONE.* 18 de junio de 2013;8(6):e66041.
91. Delgado-Ratto C, Gamboa D, Soto-Calle VE, Eede PV den, Torres E, Sánchez-Martínez L, et al. Population Genetics of *Plasmodium vivax* in the Peruvian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis.* 14 de enero de 2016;10(1):e0004376.
92. Batista CL, Barbosa S, Bastos MDS, Viana SAS, Ferreira MU. Genetic diversity of *Plasmodium vivax* over time and space: a community-based study in rural Amazonia. *Parasitology.* febrero de 2015;142(2):374-84.

93. Pacheco MA, Schneider KA, Céspedes N, Herrera S, Arévalo-Herrera M, Escalante AA. Limited differentiation among *Plasmodium vivax* populations from the northwest and to the south Pacific Coast of Colombia: A malaria corridor? *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(3):e0007310.
94. Mzilahowa T, McCall PJ, Hastings IM. “Sexual” Population Structure and Genetics of the Malaria Agent *P. falciparum*. *PLoS ONE* [Internet]. 18 de julio de 2007 [citado 7 de octubre de 2019];2(7). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1910609/>
95. Tibayrenc M, Ayala FJ. New insights into clonality and panmixia in *Plasmodium* and *Toxoplasma*. *Adv Parasitol*. 2014;84:253-68.
96. Koepfli C, Rodrigues PT, Antao T, Orjuela-Sánchez P, Eede PV den, Gamboa D, et al. *Plasmodium vivax* Diversity and Population Structure across Four Continents. *PLoS Negl Trop Dis*. 30 de junio de 2015;9(6):e0003872.
97. Imwong M, Nair S, Pukrittayakamee S, Sudimack D, Williams JT, Mayxay M, et al. Contrasting genetic structure in *Plasmodium vivax* populations from Asia and South America. *Int J Parasitol*. julio de 2007;37(8-9):1013-22.
98. Ventocilla JA, Nuñez J, Tapia LL, Lucas CM, Manock SR, Lescano AG, et al. Genetic Variability of *Plasmodium vivax* in the North Coast of Peru and the Ecuadorian Amazon Basin. *Am J Trop Med Hyg*. julio de 2018;99(1):27-32.
99. Portugal S, Carret C, Recker M, Armitage AE, Gonçalves LA, Epiphanyo S, et al. Host mediated regulation of superinfection in malaria. *Nat Med*. junio de 2011;17(6):732-7.
100. Portugal S, Drakesmith H, Mota MM. Superinfection in malaria: *Plasmodium* shows its iron will. *EMBO Rep*. 11 de noviembre de 2011;12(12):1233-42.
101. Abkallo HM, Tangena J-A, Tang J, Kobayashi N, Inoue M, Zoungrana A, et al. Within-host Competition Does Not Select for Virulence in Malaria Parasites; Studies with *Plasmodium yoelii*. *PLOS Pathog*. 6 de febrero de 2015;11(2):e1004628.
102. Organización Mundial de la Salud. Estrategia Técnica Mundial Contra la Malaria 2016-2030. 2015. 30 p.
103. Sturrock HJW, Roberts KW, Wegbreit J, Ohrt C, Gosling RD. Tackling Imported Malaria: An Elimination Endgame. *Am J Trop Med Hyg*. 8 de julio de 2015;93(1):139-44.
104. Tusting LS, Bousema T, Smith DL, Drakeley C. Measuring changes in *Plasmodium falciparum* transmission: Precision, accuracy and costs of metrics. *Adv Parasitol*. 2014;84:151-208.

105. Ferreira MU, Karunaweera ND, da Silva-Nunes M, da Silva NS, Wirth DF, Hartl DL. Population structure and transmission dynamics of *Plasmodium vivax* in rural Amazonia. *J Infect Dis*. 15 de abril de 2007;195(8):1218-26.
106. Rosas-Aguirre A, Erhart A, Llanos-Cuentas A, Branch O, Berkvens D, Abatih E, et al. Modelling the potential of focal screening and treatment as elimination strategy for *Plasmodium falciparum* malaria in the Peruvian Amazon Region. *Parasit Vectors*. 7 de mayo de 2015;8:261.
107. Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú (SENAMHI) - Loreto 2019. Disponible en Pagina Web: www.senamhi.gob.pe/main.php?dp=loreto&p=descarga-datos-hidrometeorologicos. [Internet]. [citado 7 de octubre de 2019]. Disponible en: <https://www.senamhi.gob.pe/main.php?dp=loreto&p=descarga-datos-hidrometeorologicos>
108. E.Z.N.A. Blood DNA Minikit, Omega (Bio Tek). Product Manual, January 2017. p 12.
109. Cowell AN, Loy DE, Sundararaman SA, Valdivia H, Fisch K, Lescano AG, et al. Selective Whole-Genome Amplification Is a Robust Method That Enables Scalable Whole-Genome Sequencing of *Plasmodium vivax* from Unprocessed Clinical Samples. *mBio*. 07 de 2017;8(1).
110. Karunaweera ND, Ferreira MU, Hartl DL, Wirth DF. Fourteen polymorphic microsatellite DNA markers for the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Mol Ecol Notes*. 2007;7(1):172-5.
111. Microsatellite analysis reveals connectivity among geographically distant transmission zones of *Plasmodium vivax* in the Peruvian Amazon: A critical barrier to regional malaria elimination [Internet]. [citado 2 de diciembre de 2019]. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0007876>
112. Alarcon Baldeon Jhonatan (2016). Dinámica de las Parasitemias Recurrentes de *Plasmodium vivax* por PCR en Pobladores de las Comunidades de San José de Lupuna y Cahuide de la Región Loreto. Tesis para optar el grado de maestro. p. 42.
113. Abdullah NR, Barber BE, William T, Norahmad NA, Satsu UR, Muniandy PK, et al. *Plasmodium vivax* Population Structure and Transmission Dynamics in Sabah Malaysia. *PLOS ONE*. 17 de diciembre de 2013;8(12):e82553.
114. Gunawardena S, Ferreira MU, Kapilanda GMG, Wirth DF, Karunaweera ND. The Sri Lankan paradox: high genetic diversity in *Plasmodium vivax* populations despite decreasing levels of malaria transmission. *Parasitology*. junio de 2014;141(7):880-90.

115. Lo E, Zhou G, Oo W, Lee M-C, Baum E, Felgner PL, et al. Molecular inference of sources and spreading patterns of *Plasmodium falciparum* malaria parasites in internally displaced persons settlements in Myanmar–China border area. *Infect Genet Evol.* 1 de julio de 2015;33:189-96.
116. Carrasco-Escobar G, Castro MC, Barboza JL, Ruiz-Cabrejos J, Llanos-Cuentas A, Vinetz JM, et al. Use of open mobile mapping tool to assess human mobility traceability in rural offline populations with contrasting malaria dynamics. *PeerJ.* 2019;7:e6298.
117. Banco Interamericano de Desarrollo (2010). Estudio Binacional de Navegabilidad del Rio Napo (Ecuador - Perú). p 290.

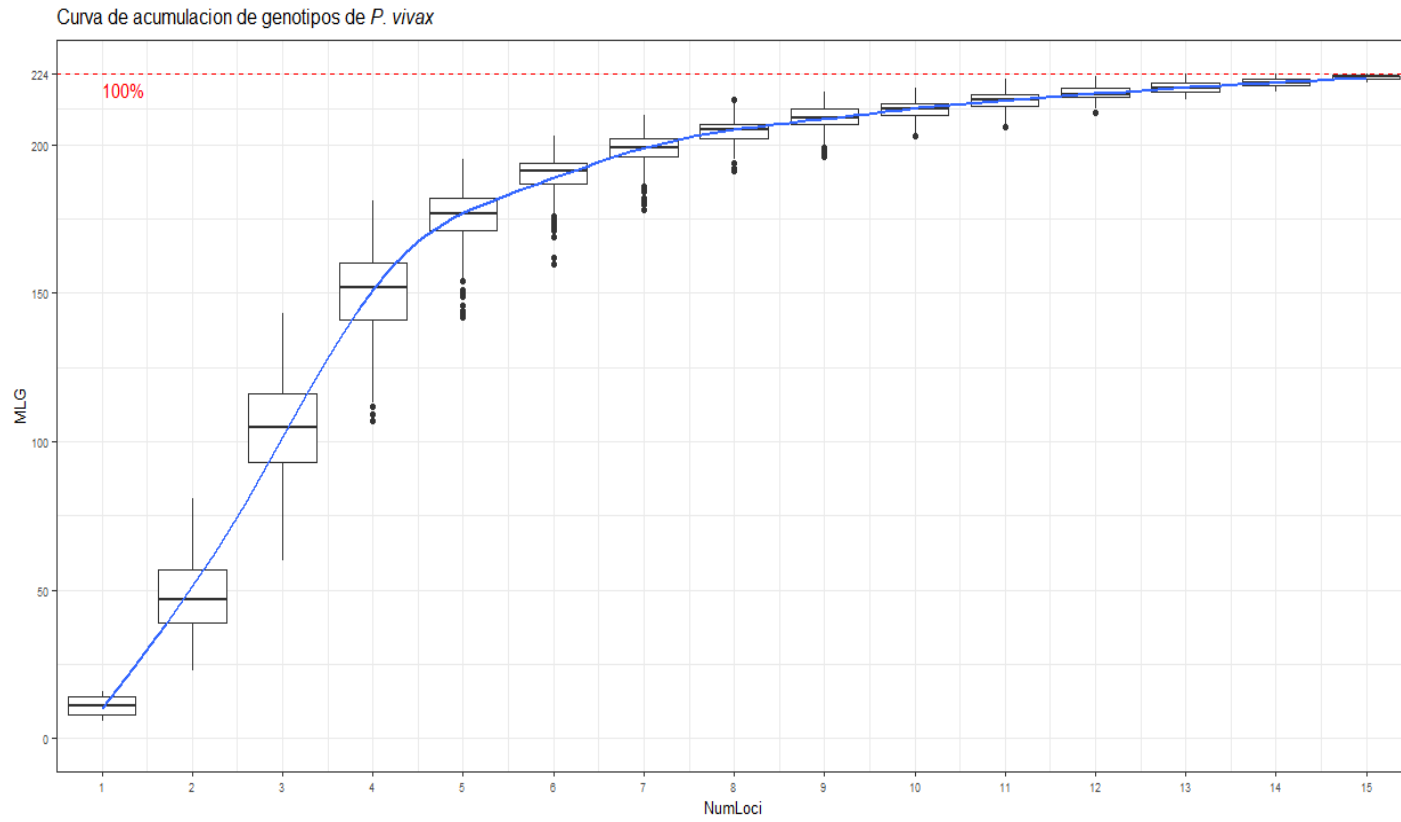
ANEXO 1: INFORMACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE LOS MICROSATÉLITES

Microsatélite	Cromosoma	Motivo de repetición	Tamaño pb	Th	Grupo	PIC	He	Número de alelos	Alelos privados
11.162	11	ATAC	222	60	1	0.793	0.8201798	15	4
14.297	14	AAG	200	57	1	0.744	0.7503912	12	4
Ch2.121	2	TTA	172	67	1	0.822	0.8322884	12	3
Ch2.152	2	AAT	153	63	1	0.819	0.8618077	17	10
Ch14.2986	14	AT	175	57	2	0.670	0.705835	6	8
Ch14.3010	14	AT	207	60	2	0.711	0.7571235	13	6
Ch14.3021	14	TA	228	57	2	0.655	0.7360656	11	8
Ch2.122	2	ATA	197	60	2	0.554	0.5108025	12	4
13.239	13	TTTA	210	58	3	0.591	0.6066667	5	2
Ch14.2981	14	AT	161	63	3	0.799	0.8388106	12	5
MS6	11	(TCC)2(TCT)3(CCT)2(TCC)2GCTTCT(TCC)10	241	57	3	0.713	0.7336842	9	2
MS9	8	(GGA)18	188	57	3	0.845	0.7308257	23	12
3.502	3	AACGGATG	168	55	4	0.712	0.7589782	8	5
MS15	5	(TCT)10	243	57	4	0.708	0.7279563	11	9
MS20	10	(GAA)11GAG(GAA)13(CAA)4GAA(CAA)5	211	60	4	0.793	0.8518177	14	6
MS4	6	(AGT)18	220	57	4	0.7824	0.7804878	12	5

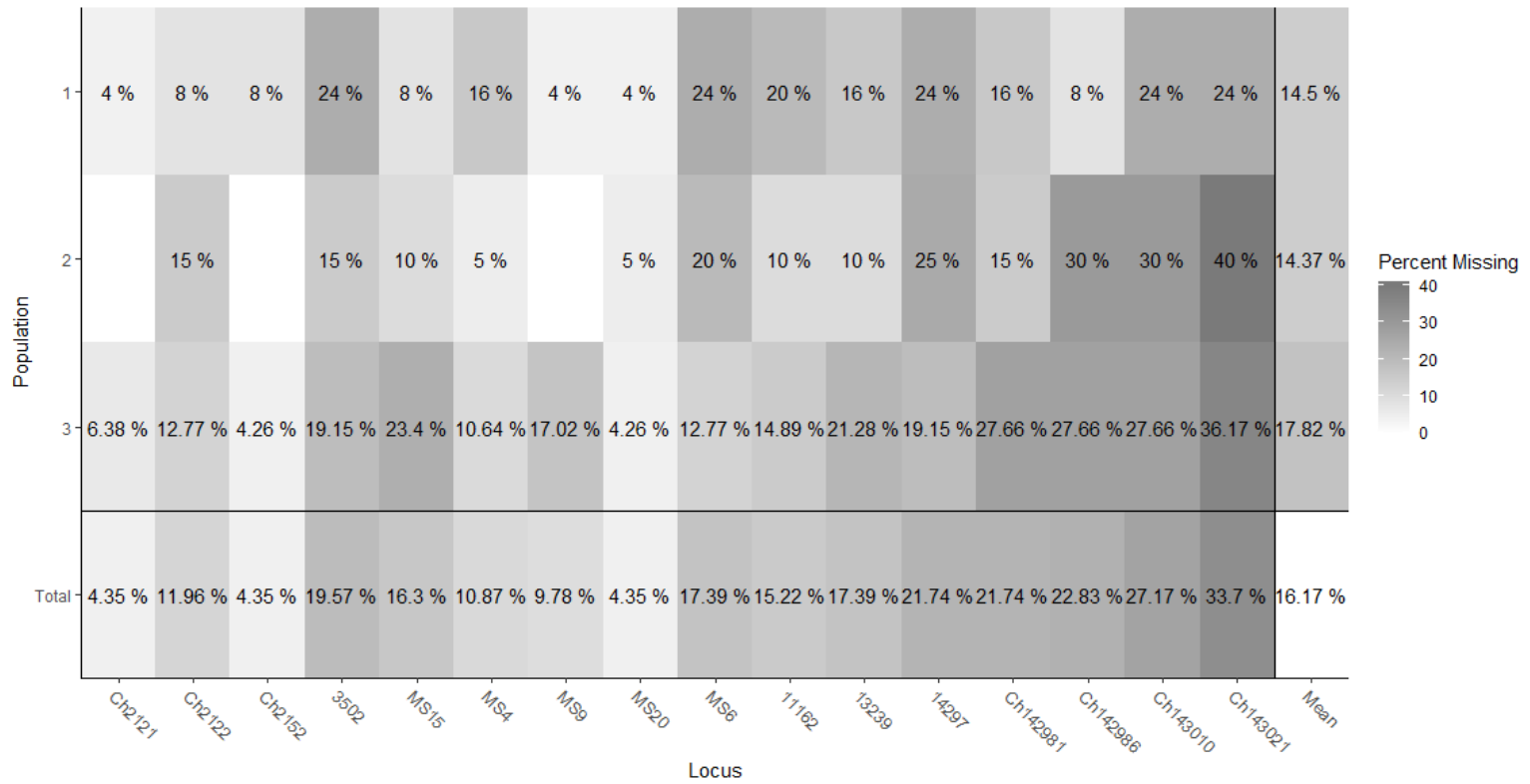
ANEXO 2: INFORMACIÓN DE MUESTRAS SELECCIONADAS PARA LOS ANALISIS DEL ESTUDIO

Estrategias	1	2	3	Total
Muestras diagnosticas nuevamente y positivas en total	190	157	237	584
Muestras separadas del análisis en total	145	118	134	397
Porcentaje de perdida por separación de muestras	76%	75%	56%	-
proporción de muestras separadas del análisis	0.7631	0.7515	0.5654	-
Muestras genotipificadas	45	39	103	187
Muestras con > 70% de locis amplificados	25	20	47	92
% de infecciones submicroscopicas (≤ 3 par/ μ l)	81	89	64	234

ANEXO 3: CURVA DE ACUMULACIÓN DE GENOTIPOS PARA EL ESTUDIO



ANEXO 4: PORCENTAJE DE MUESTRAS NO GENOTIPIFICABLES POR CADA ESTRATEGIA DE CONTROL



**ANEXO 5: ANÁLISIS MOLECULAR DE LA VARIANZA DENTRO Y
ENTRE CADA ESTRATEGIA DE CONTROL**

Componentes de Varianza	Sigma	%
Variación entre estrategias	0.0115065	3.8
Variación dentro de las estrategias	0.2916957	96.2
Variación total	0.3032022	100

Componentes de Covarianza	sigma	%
Variación entre estrategias	0.00723193	2.381186
Variación entre muestras dentro de estrategias	0.0084092	2.768813
Variación dentro de muestras	0.28807016	94.850001
Total de Variación	0.30371129	100

ANEXO 6: DIFERENCIACIÓN GENÉTICA ENTRE ESTRATEGIAS A TRAVES DEL TIEMPO

	1_Mes0	2_Mes0	3_Mes0	1_Mes12	2_Mes12	3_Mes12	1_Mes18	2_Mes18
2_Mes0	0.1717316							
3_Mes0	0.2300339	0.1384002						
1_Mes12	0.3068479	0.2935372	0.3704387					
2_Mes12	0.2090561	0.2885352	0.2815644	0.1798022				
3_Mes12	0.3634059	0.4296818	0.3253742	0.4343341	0.3800132			
1_Mes18	0.240733	0.3133254	0.2300543	0.3584427	0.3360988	0.1512794		
2_Mes18	0.3393208	0.4763379	0.3183258	0.4308764	0.363488	0.2012266	0.3055004	
3_Mes18	0.2307577	0.2241809	0.1946524	0.3233084	0.2929927	0.2251491	0.2085676	0.3423231

ANEXO 7: PROPORCIÓN DE INFECCIONES POLICLONALES POR ESTRATEGIA.

Estrategias	Antes (Mes0)		Después (Mes12 y 18)		Intervalo de confianza al 95%	p-valor	Poder
	Policlonales	Monoclonales	Policlonales	Monoclonales			
1	8	19	5	13	[0.2458917 - 5.2632049]	1	0.04
2	3	21	9	6	[0.01340852 - 0.57301892]	0.004	0.82
3	12	58	7	26	[0.2451359 - 2.5895772]	0.5292	0.08
Total	23	98	21	45	-	-	-

ANEXO 8: VALORES DE LAS METRICAS GENETICO POBLACIONAL POR ESTRATEGIA DE CONTROL

Estrategias	Tiempo	N	MLG	N.all	Na.e	Hexp	H.sd	Var.intra.H	T.M.P	dst T.M.P	LD (I_A^S)	p.rD
1	Mes_0	14	14	4.438	2.853	0.649	0.14	0.017	2.774	0.565	0.155	0.001
	Mes_1											
	2	4	4	2.563	5.053	0.802	0.274	0.093	8.025	3.81	0.051	0.694
	Mes_1											
	8	7	7	3.5	3.567	0.72	0.171	0.027	3.497	1.228	0.003	0.761
	Total	25	25	6.438	3.467	0.712	0.12	0.007	4.342	0.957	0.104	0.001
2	Mes_0	9	9	3.875	4.166	0.76	0.125	0.025	5.959	1.545	0.014	0.626
	Mes_1											
	2	7	7	3.563	3.81	0.738	0.175	0.022	3.728	1.439	0.074	0.131
	Mes_1											
	8	4	4	2.313	3.692	0.729	0.285	0.097	4.248	1.33	0.002	0.631
	Total	20	20	5.75	4.326	0.769	0.081	0.005	7.659	1.388	0.045	0.098
3	Mes_0	25	25	6.188	4.034	0.752	0.115	0.006	5.868	1.42	0.015	0.304
	Mes_1											
	2	6	6	3.125	2.927	0.658	0.308	0.029	3.727	1.772	0.12	0.005
	Mes_1											
	8	16	16	5	3.512	0.715	0.181	0.01	3.299	1.066	0.075	0.01
	Total	47	47	7.625	4.013	0.751	0.122	0.003	5.482	1.679	0.033	0.075

N: número de individuos, MLG: genotipos multilocus, N.all: numero promedio de alelos, Na.e: número promedio de alelos efectivos, He: Heterocigicidad esperada, H.sd: desviación estándar de la Heterocigicidad esperada, Var.intra.H: varianza intrapoblacional de la Heterocigicidad, T.M.P (θ): Tasa mutacional poblacional, dst R.M.P = Desviación estándar de la tasa mutacional Poblacional, LD: desequilibrio de ligamiento, p-valor LD: Significancia estadística del Desequilibrio de ligamiento.

**ANEXO 9: TEST DE MONTECARLO DE LAS METRICAS GENETICO
POBLACIONAL**

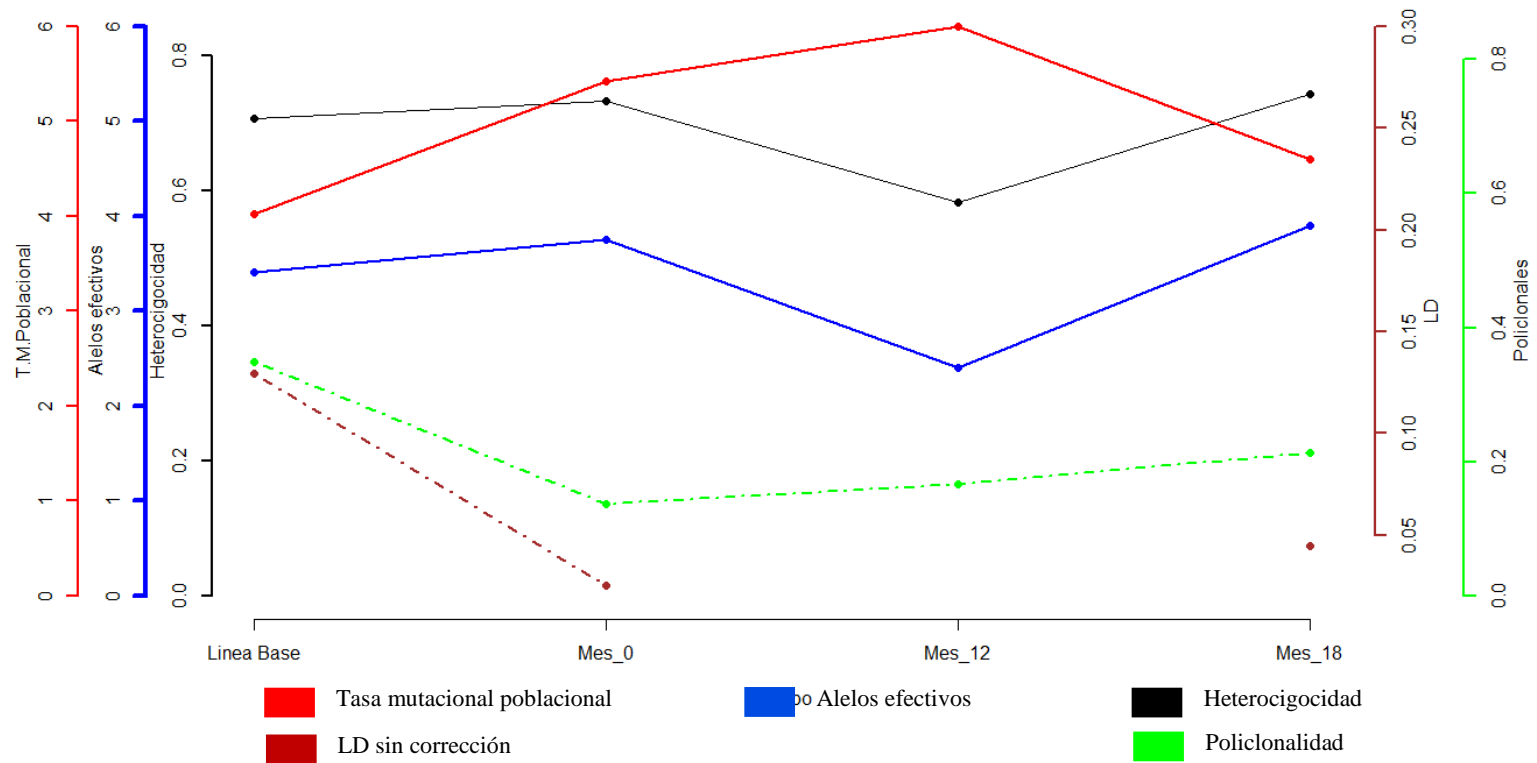
Estrategia	Metricas Genético Poblacional	Tiempo	p-valor
1	Heterocigocidad (<i>He</i>)	Mes 0-Mes12	0.649
		Mes 0-Mes12	0.559
		Mes12-Mes18	0.704
	Tasa Mutacional poblacional	Mes 0-Mes12	0.734
		Mes 0-Mes12	0.832
		Mes12-Mes18	0.621
	Alelos efectivos	Mes 0-Mes12	0.821
		Mes 0-Mes12	0.943
		Mes12-Mes18	0.871
2	Heterocigocidad (<i>He</i>)	Mes 0-Mes12	0.627
		Mes 0-Mes12	0.546
		Mes12-Mes18	0.329
	Tasa Mutacional poblacional	Mes 0-Mes12	0.843
		Mes 0-Mes12	0.821
		Mes12-Mes18	0.672
	Alelos efectivos	Mes 0-Mes12	0.321
		Mes 0-Mes12	0.431
		Mes12-Mes18	0.212
3	Heterocigocidad (<i>He</i>)	Mes 0-Mes12	0.278
		Mes 0-Mes12	0.197
		Mes12-Mes18	0.064
	Tasa Mutacional poblacional	Mes 0-Mes12	0.212
		Mes 0-Mes12	0.453
		Mes12-Mes18	0.511
	Alelos efectivos	Mes 0-Mes12	0.223
		Mes 0-Mes12	0.873
		Mes12-Mes18	0.512

ANEXO 10: COMPARACIÓN DE METRICAS GENETICO POBLACIONAL ENTRE ESTRATEGIAS

Estrategia	dif	chi- cuadrado	p-valor
Numero de alelos efectivos	2	1.1556	0.5611
Heterocigocidad (He)	2	1.2556	0.5211
Tasa Mutacional Poblacional (θ)	2	1.0667	0.5866
Desequilibrio de ligamiento (I_A^S)	2	1.8667	0.3932

Test Kruskal wallis, test de significancia p-valor < 0.05

ANEXO 11: EFECTO DE LA ESTRATEGIA 3 EN LA COMUNIDAD DE LIBERTAD



ANEXO 12: VALORES DE LAS METRICAS GENETICO POBLACIONALES DE LA ESTRATEGIA 03 EN LA COMUNIDAD DE LIBERTAD

Pop	N	MLG	N.all	Na.e	Hexp	H.sd	Var.intra.H	T.M.P	dst T.M.P	LD (I_A^S)	p.rD
Linea Base	76	62	6.375	3.409	0.707	0.127	0.001	4.017	1.052	0.110	0.001
Mes 0	6	6	2.938	3.750	0.733	0.253	0.044	5.422	2.148	0.049	0.374
Mes12	3	3	1.813	2.400	0.583	0.375	0.101	6.000	1.279	0.236	0.042
Mes18	9	9	3.813	3.899	0.744	0.146	0.019	4.604	1.596	0.082	0.003
Total	94	80	7.938	3.639	0.725	0.117	0.001	4.790	1.119	0.090	0.001

N: número de individuos, MLG: genotipos multilocus, Na.e: número promedio de alelos efectivos, N.all: número promedio de alelos, He: Heterocigocidad esperada, H.sd: desviación estándar de la heterocigocidad esperada, Var.intra.H: varianza intrapoblacional de la Heterocigocidad, T.M.P (θ): Tasa mutacional poblacional, dst R.M.P = Desviación estándar de la tasa mutacional poblacional, LD: desequilibrio de ligamiento, p-valor LD: Significancia estadística del desequilibrio de ligamiento.

ANEXO 13: PROPORCIÓN DE INFECCIONES POLICLONALES EN LA COMUNIDAD DE LIBERTAD

Temporada	p- valor	Intervalo de confianza - 95%	Poder Estadístico
Linea Base - Mes0	0.03895	[1.035804 - 14.138389]	0.5821
Linea Base - Mes12	0.6619	[0.2825385 - 130.1088355]	-
Linea Base - Mes18	0.3811	[0.4757355 - 11.5950664]	-
Mes 0- Mes12	1	[0.05918627 - 47.18289357]	-
Mes 0 - Mes18	0.6646	[0.08401237 - 4.74998208]	-
Mes 12- Mes18	1	[0.01167325 - 12.38606250]	

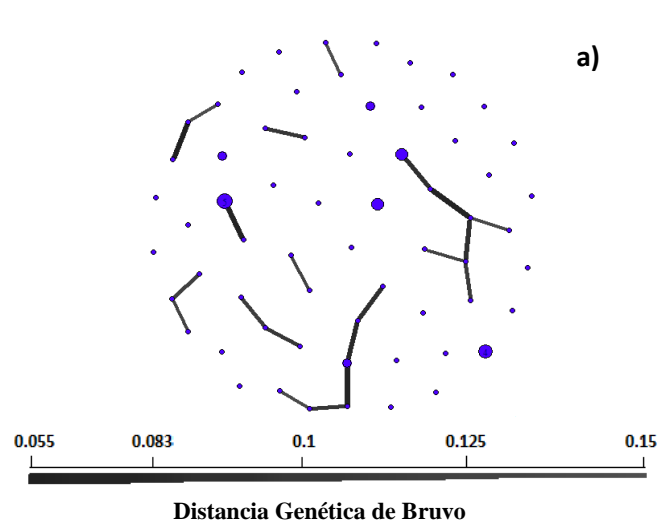
**ANEXO 14: TEST DE CUELLO DE BOTELLA ANTES Y DESPUÉS DE LA IMPLEMENTACIÓN DE LAS TRES
ESTRATEGIAS**

Population	Media de tamaño poblacional	Media del número de alelos	Test Wilcoxon	
			(test 1 cola) p-valor	(test- 2 colas) p-valor
1_Mes 0 (antes)	11.75	4.44	0.999466	0.001343
1_Mes12 y 1_Mes18 (después)	9.63	4.69	0.92807	0.159058
2_Mes0 (antes)	7.38	3.88	0.851074	0.32251
2_Mes12 y 2_Mes18 (después)	9.75	4.38	0.46994	0.93988
3_Mes0 (antes)	19.63	6.19	0.851074	0.32251
3_Mes12 y 3_Mes18 (después)	19	5.75	0.851074	0.32251

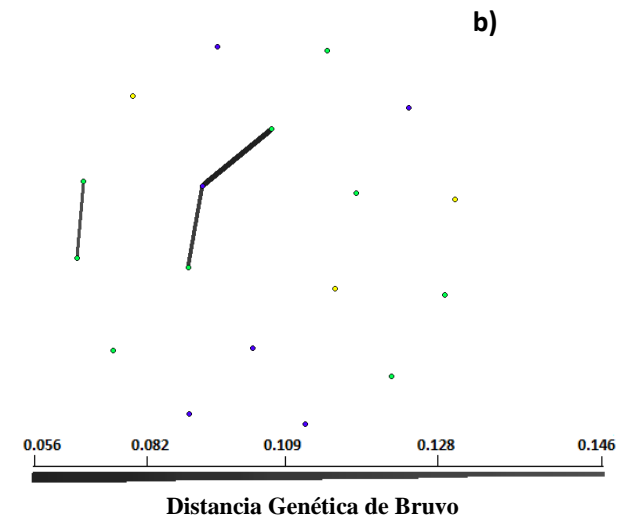
ANEXO 15: TEST EXACTA DE FISHER, PROPORCIÓN DE HAPLOTIPOS RELACIONADOS

Población	MES12 y		p-valor	95% Confidence interval	Poder estadístico
	MES 0	18			
Estrategia 1	6/8	0/11	0.01957	[1.164326 - Inf]	0.795
Estrategia 2	0/9	2/9	0.4789	[0.000000 - 7.709768]	0.0727
Estrategia 3	6/19	2/20	0.2529	[0.4741903 - 34.9416968]	0.365
Libertad	37/38	5/13	0.1192	[0.7448855 - 9.9070378]	1
Cuenca Mazán	7/24	2/13	0.6959	[0.2944184 - 21.0298313]	0.1121
Cuenca Napo	2/13	2/25	0.608	[0.1238836 - 28.9221112]	0.1002

ANEXO 16: RED DE EXPANSIÓN DE HAPLOTIPOS DE *P. vivax* EN LA COMUNIDAD DE LIBERTAD



Año 2015



Mes0, Mes 12 y Mes 18 (Años 2016- 2017)

ANEXO 17: PORCENTAJE DE INFECCIONES POLICLONALES EN LAS CUENCAS MAZAN Y NAPO.

Cuenca	Temporada	N	Policlonales	Monoclonales	Poli (%)
Mazan	Mes 0	60	10	50	16.67
	Mes 12	21	9	12	42.86
	Mes 18	24	5	19	20.83
Total		105	24	81	22.86
Napó	Mes 0	61	13	48	21.31
	Mes 12	10	4	6	40.00
	Mes 18	11	3	8	27.27
Total		82	20	62	24.39

ANEXO 18: COMPARACIÓN ENTRE LA PROPORCIÓN DE INFECCIONES POLICLONALES EN LA CUENCA MAZAN

Temporada	p-valor	Intervalo de confianza - 95%	Poder estadístico
Mes 0- Mes12	0.03293	[0.07790603 - 0.93460528]	0.6198
Mes 0 - Mes18	0.7541	[0.2035088 - 3.2252755]	-
Mes 12- Mes18	0.1961	[0.6486717 -13.3624869]	-

ANEXO 19: COMPARACIÓN ENTRE LA PROPORCIÓN DE INFECCIONES POLICLONALES EN LA CUENCA DE NAPO

Temporada	p-valor	Intervalo de confianza - 95%	Poder estadístico
Mes 0- Mes12	0.2369	[0.08250452 - 2.28990421]	-
Mes 0 - Mes18	0.6992	[0.1453997 - 4.8424543]	-
Mes 12- Mes18	0.6594	[0.2019998 - 16.7595375]	-

ANEXO 20: COMPARACIÓN DE LAS MÉTRICAS GENÉTICO POBLACIONAL ENTRE LAS CUENCAS MAZAN Y NAPO.

Métricas Genetico Poblacional	dif	chi- cuadrado	p-valor
Número de alelos efectivos	1	2.4233	0.1266
Heterocigocidad (He)	1	2.3333	0.1466
Tasa Mutacional Poblacional (θ)	1	3.8571	0.0561
Desequilibrio de ligamiento (D)	1	0.4285	5127

ANEXO 21: EFECTO DE LAS TRES ESTRATEGIAS JUNTAS EN LA CUENCA DE MAZAN.

Tiempo	N	MLG	N.all	Na.e	Hexp	H.sd	Var.intra.H	T.M.P	dst T.M.P	LD (I_A^S)	p.rD
Mes_0	17	17	5.000	4.042	0.753	0.088	0.009	6.545	1.253	0.027	0.146
Mes_12	13	13	4.875	3.937	0.746	0.106	0.011	5.872	1.195	0.080	0.010
Mes_18	16	16	5.250	4.067	0.754	0.108	0.008	6.168	1.352	0.066	0.016
Total	46	46	7.938	4.313	0.768	0.082	0.002	7.530	1.607	0.052	0.002

N: número de individuos, MLG: genotipos multilocus, Na.e: numero promedio de alelos efectivos, N.all: numero promedio de alelos, He: Heterocigocidad esperada, H.sd: desviación estándar de la Heterocigocidad esperada, Var.intra.H: varianza intrapoblacional de la Heterocigocidad, T.M.P (θ): Tasa mutacional poblacional, dst T.M.P = Desviación estándar de la tasa mutacional poblacional, LD: desequilibrio de ligamiento, p-valor LD: Significancia estadística del desequilibrio de ligamiento.

ANEXO 22: EFECTO DE LAS TRES ESTRATEGIAS JUNTAS EN LA CUENCA NAPO.

Tiempo	N	MLG	N.all	Na.e	Hexp	H.sd	Var.intra.H	T.M.P	dst T.M.P	LD (I_A^S)	p.rD
Mes_0	31	31	6.313	3.678	0.728	0.117	0.005	4.909	1.150	0.048	0.001
Mes_12	4	4	2.563	4.000	0.750	0.279	0.074	5.134	1.784	0.202	0.136
Mes_18	11	11	4.250	3.240	0.691	0.228	0.013	4.758	1.327	0.067	0.030
Total	46	46	7.250	3.701	0.730	0.113	0.003	4.921	1.375	0.048	0.001

N: número de individuos, MLG: genotipos multilocus, Na.e: numero promedio de alelos efectivos, N.all: numero promedio de alelos, He: Heterocigocidad esperada, H.sd: desviación estándar de la heterocigocidad esperada, Var.intra.H: varianza intrapoblacional de la Heterocigocidad, T.M.P (θ): Tasa mutacional poblacional, dst T.M.P = Desviación estándar de la tasa mutacional Poblacional, LD: desequilibrio de ligamiento, p-valor LD: Significancia estadística del desequilibrio de ligamiento.

ANEXO 23: TEST DE CUELLO DE BOTELLA ANTES Y DESPUÉS DE LA IMPLEMENTACIÓN DE LAS TRES ESTRATEGIAS EN LAS CUENCAS NAPO Y MAZAN

Cuenca/Temporada	Media de tamaño poblacional	Media del número de alelos	Test Wilcoxon	
			(test 1 cola) p-valor	(test- 2 colas) p-valor
Napo_Mes 0 (antes)	25.13	6.31	0.941666	0.12973
Napo_Mes12 y Mes18 (después)	13.06	4.88	0.912323	0.19281
Mazan_Mes0 (antes)	25.31	6.88	0.958374	0.093445
Mazan_Mes12 y Mes18 (después)	13.63	5	0.683914	0.668549

ANEXO 24: INFECCIONES RECURRENTE EN LA ESTRATEGIA 3

Comunidad	Muestra	231009075	231009078	231014041	231014045	231014048	231053031
Libertad	231009078	0.28125					
	231014041	0.6559245	0.4477539				
	231014045	0.2916667	0.4984976	0.5935059			
	231014048	0.7288411	0.7401123	0.6561686	0.8158366		
	231053031	0.6246745	0.9306641	0.6145833	0.7298061	0.7456055	
	231053035	0.3125	0.5749756	0.46875	0.7109375	0.4986979	0.9372559

ANEXO 25: INFECCIONES RECURRENTES EN LA ESTRATEGIA 1

Comunidad	Muestra	21400304	21400304	21404701	21404701	21105401	21105401	21107201	21107201	21200803	21200803	21203203
		1	8	1	2	1	5	1	5	5	8	5
Urco Miraño	214003048	0.748										
	214047011	0.480	0.579									
	214047015	0.646	0.521	0.290								
Huaman Hurco	211054011	0.323	0.621	0.408	0.483							
	211054015	0.656	0.639	0.531	0.719	0.298						
	211072011	0.482	0.687	0.461	0.524	0.159	0.277					
	211072015	0.438	0.599	0.562	0.482	0.617	0.583	0.713				
Iro de Enero	212008035	0.375	0.721	0.595	0.547	0.694	0.639	0.717	0.406			
	212008038	0.437	0.544	0.439	0.318	0.223	0.560	0.375	0.499	0.556		
	212032035	0.921	0.681	0.627	0.647	0.730	0.574	0.701	0.698	0.730	0.701	
	212032038	0.687	0.723	0.734	0.816	0.773	0.553	0.698	0.936	0.741	0.718	0.593

**ANEXO 26: ALELOS COMPARTIDOS Y PRIVADOS DE LAS
INFECCIONES RECURRENTES**

Comunidad	Muestras	alelos privados	alelos compartidos
Libertad	231009075	5	3
	231009078	8	
Libertad	231014041	4	0
	231014045	7	
	231014048	3	
Libertad	231053031	2	0
	231053035	2	
Urco Miraña	214003041	0	1
	214003048	2	
Urco Miraña	214047011	2	2
	214047015	1	
Huaman Urco	211072011	4	1
	211072015	1	
Primero de Enero	212008035	3	4
	212008038	1	
Primero de Enero	212032035	8	2
	212032038	10	

ANEXO 27: MUESTRAS AMPLIFICADAS POR CADA MARCADOR Y POR ESTRATEGIA

Marcador	Muestras	ESTRATEGIAS			92 muestras			Total de 92 muestras
		1	2	3	Est1	Est2	Est3	
*Ch2121	159	39	32	88	23	20	43	86
*Ch2122	109	30	22	57	21	17	35	73
*Ch2152	145	31	35	79	23	20	45	88
3502	101	25	23	53	19	17	37	73
MS15	96	25	23	48	21	18	36	75
*MS4	125	32	29	64	21	19	43	83
*MS9	158	39	35	84	23	20	39	82
*MS20	145	37	29	79	20	21	45	86
MS6	92	22	17	53	18	13	38	69
*11162	107	25	23	59	18	18	42	78
*13239	90	24	20	46	21	18	37	76
14297	83	20	17	46	19	15	37	71
Ch142981	90	25	22	43	20	17	32	69
Ch142986	89	31	20	38	21	14	35	70
Ch143010	94	25	21	48	19	13	33	65
Ch143021	83	25	17	41	19	12	30	61

***Microsatelites con mayor número de amplificación en todas las muestras evaluadas**