

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

**Análisis de la diversidad genética y estructura genético
- poblacional de Plasmodium vivax en Santa Emilia
(Iquitos, Loreto) a partir de marcadores microsatélites**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista
Biotecnólogo

AUTOR

Julio Jorge MIRANDA ALBAN

ASESOR

Mónica ARAKAKI MAKISHI
Dionicia GAMBOA VILELA

Lima - Perú

2017

DEDICATORIA

A mis padres, María Getrudis Albán Suárez y Julio Javier Miranda More, por ser la luz más grande e intensa que ilumina mi universo. No existe felicidad más grande en mi vida que el hacerlos sentir orgullosos cada día, es una sensación indescriptible e incomparable para mí.

A mi mamá Josefina, por todo su sacrificio y dedicación, siempre al servicio de sus hijos. Me siento bendecido por haber sido criado desde pequeño por ti y porque todas las cosas que he podido alcanzar en mi vida son gracias a ti también. Te aseguro que no existe mejor madre que tú.

A la mamá Socorro, porque desde el momento que dijiste: “Y un día dirán que este es nieto de la Socorro More de Miranda”, una energía inexplicable recorre mi cuerpo recordándome que no puedo defraudarte, ni a ti, ni a mi papá, ni a nuestra familia.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora externa, la Dra. Dionicia Gamboa, por haberme dado la oportunidad de aprender durante 4 años y medio en su grupo de investigación, el Laboratorio de Malaria de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Realmente podría escribir un libro con todas las enseñanzas que obtuve en este lugar. Cada consejo, cada regaño y cada muestra de apoyo ha sido muy importante en mi vida, tanto para mi formación como científico como persona.

A Paulo Manrique, quien no solo fue un co-asesor extraoficial durante el desarrollo de este trabajo, sino que fue la persona que guió mis pasos en el laboratorio desde el día que llegué. A lo largo de todo este tiempo me enseñaste miles de cosas nuevas, corregiste mis innumerables errores y te esforzaste en formarme para que en el futuro pueda ser un científico de respeto. Estoy convencido de que no podría haber encontrado un mejor mentor para dar mis primeros pasos en el mundo de la investigación.

A la Dra. Mónica Arakaki, por aceptar el desafío de ser mi asesora interna durante el desarrollo de este trabajo. Por apoyarme aun sabiendo acerca de la situación apremiante en la que me encontraba, y animarse a explorar junto conmigo un área tan interesante como la genética poblacional del parásito causante de la malaria. Gracias por todo su tiempo y dedicación.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Malaria que colaboraron con la realización de este trabajo y de los distintos proyectos en los cuales hemos participado juntos: Mac Aguirre, Lidia Llacsahuanga, Jhonatan Alarcón, Roberson Saavedra y Gabriel Carrasco. Asimismo, a los miembros del Laboratorio Satélite de Iquitos, porque sin su labor, sería imposible para nosotros la realización de algún proyecto de investigación.

A mis amigos fuera del laboratorio, porque sin sus consejos y apoyo incondicional nunca podría alcanzar todos los objetivos que me propongo. La realización de esta tesis es solo una meta más a la que he podido llegar gracias ustedes. Gracias Pili, Sergio, Luz Elisa, Carlos, Jéssica, Jesús, Jonathan y todos aquellos que de alguna manera pusieron su granito de arena para hacer de mí una mejor persona y un mejor profesional.

A todos los miembros de mi familia. Mis hermanos, primos, tíos, sobrinos, etc, quienes me han apoyado y manifestado su aprecio y cariño en todo momento. Doy testimonio de que toda persona se hace más fuerte cuando tiene el respaldo de su familia.

A mi alma máter, la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, nuestra relación de amor-odio crece día a día con los innumerables hechos que me causan admiración y orgullo, y también con aquellos que me causan indignación e impotencia. Gracias por las múltiples enseñanzas que han hecho de mí el profesional que soy, espero poder ser cada día mejor para así representar tu nombre con orgullo. Gracias especiales a todos mis profesores de la Facultad de Ciencias Biológicas, sobre todo a aquellos que se ponen la camiseta de mi querida Escuela Profesional de Genética y Biotecnología.

LISTA DE ABREVIATURAS

- Ácido desoxirribonucleico (ADN)
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)
- Ácido ribonucleico ribosomal (ARNr)
- Amplificación aleatoria de ADN polimórfimo (RAPD)
- Análisis discriminador de componentes principales (DAPC)
- Buffer Tris-HCl, EDTA (TE)
- Buffer Tris-HCl, EDTA, NaCl (TEN)
- Ciclo umbral o de cuantificación (C_q)
- Desequilibrio de ligamiento (LD)
- Dodecil Sulfato de Sodio (SDS)
- Heterocigosidad esperada (*He*)
- Índice de asociación estandarizada (I^S_A)
- Multiplicidad de infección (MOI)
- PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR)
- Polimorfismo en la longitud del fragmento amplificado (AFLP)
- Polimorfismo en la longitud del fragmento de restricción (RFLP)
- Polimorfismo de nucleótido simple (SNP)
- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	x
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1. La malaria y el género <i>Plasmodium</i>	4
2.2. Epidemiología de la malaria en el mundo	5
2.3. Epidemiología de la malaria en el Perú.....	7
2.4. Biología de <i>Plasmodium vivax</i>	9
2.5. Métodos de diagnóstico de malaria	11
2.6. Marcadores moleculares y aplicación de la genética de poblaciones en el estudio de la malaria causada por <i>P. vivax</i>	12
2.7. Microsatélites como marcadores para estudiar la genética poblacional de <i>P. vivax</i>	14
3. OBJETIVOS	17
3.1. Objetivo general	17
3.2. Objetivos específicos.....	17
4. HIPÓTESIS	17
5. MATERIAL Y MÉTODOS	18
5.1. Consentimiento ético	18

5.2.	Área y población de estudio.....	18
5.3.	Diseño muestral del estudio.....	20
5.4.	Selección de marcadores	22
5.5.	Selección de muestras	22
5.6.	Procedimientos de laboratorio	23
5.6.1	Extracción de ADN	23
5.6.2	Diagnóstico y cuantificación de ADN	24
5.6.3	Clasificación de muestras y re-amplificación genómica total.....	25
5.6.4	Amplificación de microsatélites	25
5.6.5	Electroforesis en gel de agarosa.....	26
5.6.6	Electroforesis capilar	26
5.7.	Estrategia de análisis.....	26
5.7.1	Depuración de los datos.....	26
5.7.2	Análisis de diversidad genética.....	27
5.7.3	Análisis de desequilibrio de ligamiento (LD)	28
5.7.4	Análisis de estructuración genético-poblacional	28
5.7.5	Análisis de asociación entre la estructuración genético-poblacional del parásito y las características epidemiológicas de los habitantes de la comunidad.....	29
6.	RESULTADOS.....	31
6.1.	Características de la población de estudio.....	31
6.2.	Genotipificación de <i>P. vivax</i>	32
6.3.	Diversidad genética de <i>P. vivax</i>	36
6.4.	Desequilibrio de ligamiento.....	39
6.5.	Estructuración genético-poblacional	41
6.6.	Asociación entre la estructuración genético-poblacional de <i>P. vivax</i> y las características epidemiológicas de los habitantes de la comunidad	51
7.	DISCUSIÓN.....	54
7.1.	Multiplicidad de infección.....	54
7.2.	Diversidad genética	55

7.3. Desequilibrio de ligamiento.....	64
7.4. Estructuración genético-poblacional	65
7.5. Asociación de la estructuración genético-poblacional con las características epidemiológicas	66
7.6. Santa Emilia y la transmisión de <i>P. vivax</i> en la Amazonía peruana	67
8. CONCLUSIONES.....	69
9. LIMITACIONES.....	70
10. RECOMENDACIONES	71
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
12. ANEXOS	88
13. GLOSARIO	94

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: ENDEMICIDAD DE LA MALARIA A NIVEL MUNDIAL ENTRE LOS AÑOS 2000 Y 2015.....	5
FIGURA 2: MAPA DE RIESGO DE MALARIA POR <i>P. VIVAX</i> EN EL PERÚ.....	5
FIGURA 3: CASOS DE MALARIA POR <i>P. VIVAX</i> EN EL PERÚ EN LOS ÚLTIMOS AÑOS.....	5
FIGURA 4: CICLO DE VIDA DE <i>P. VIVAX</i>	5
FIGURA 5: UBICACIÓN DE LA COMUNIDAD DE SANTA EMILIA EN EL DEPARTAMENTO DE LORETO	5
FIGURA 6: DISEÑO DEL ESTUDIO	5
FIGURA 7: FLUJOGRAMA DE SELECCIÓN DE MUESTRAS Y ANÁLISIS	5
FIGURA 8: NÚMERO DE INFECCIONES DE <i>P. VIVAX</i> POR MES EN SANTA EMILIA	5
FIGURA 9: ESTRATIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS INCLUIDAS EN EL ANÁLISIS GENÉTICO-POBLACIONAL	5
FIGURA 10: PORCENTAJE DE DATOS PERDIDOS POR CADA MARCADOR.....	5
FIGURA 11: CURVA DE ACUMULACIÓN DE GENOTIPOS	5
FIGURA 12: DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO PAREADO ENTRE LOS LOCI EVALUADOS	5
FIGURA 13: EVALUACIÓN DEL NÚMERO MÁS PROBABLE DE CLUSTERS PRESENTE EN LA POBLACIÓN.....	5
FIGURA 14: ESTRUCTURACIÓN GENÉTICO-POBLACIONAL DE <i>P. VIVAX</i> EN SANTA EMILIA	5
FIGURA 15: ESQUEMA DE LA SUBDIVISIÓN DE CLUSTERS EN LA POBLACIÓN DE <i>P. VIVAX</i> DE SANTA EMILIA	5
FIGURA 16: RED DE HAPLOTIPOS (MINIMUM SPANNING NETWORK) PARA K=2	5
FIGURA 17: RED DE HAPLOTIPOS (MINIMUM SPANNING NETWORK) PARA K=4	5
FIGURA 18: RED DE HAPLOTIPOS (MINIMUM SPANNING NETWORK) PARA K=7	5
FIGURA 19: ANÁLISIS DISCRIMINATORIO DE COMPONENTES PRINCIPALES (DAPC) PARA K=2	5

FIGURA 20: ANÁLISIS DISCRIMATORIO DE COMPONENTES PRINCIPALES (DAPC) PARA K=4	5
FIGURA 21: ANÁLISIS DISCRIMATORIO DE COMPONENTES PRINCIPALES (DAPC) PARA K=7	5
FIGURA 22: ESQUEMA DE LA RELACIÓN ENTRE LOS CLUSTERS FORMADOS PARA CADA VALOR DE K.....	5

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS Y DE LAS INFECCIONES CAUSADAS POR <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i> , <i>P. KNOWLESI</i> , <i>P. MALARIAE</i> , <i>P. OVALE</i> Y <i>P. VIVAX</i>	5
TABLA 2: DIVERSIDAD GENÉTICA (HE) POR CADA LOCUS EVALUADO.	5
TABLA 3: DIVERSIDAD GENÉTICA (HE) POR TEMPORADA EN LA POBLACIÓN TOTAL ANALIZADA (103) Y CONSIDERANDO SOLO UNA MUESTRA POR PERSONA (85).....	5
TABLA 4: ÍNDICES DE DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO (I^S_A) PARA LA POBLACIÓN TOTAL ANALIZADA (103) Y CONSIDERANDO SOLO UNA MUESTRA POR HAPLOTIPO (81)..	5
TABLA 5: ASOCIACIÓN DE LA ESTRUCTURACIÓN GENÉTICA CON LOS DATOS EPIDEMIOLÓGICOS.	5
TABLA 6: COMPARACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA (HE) DE SANTA EMILIA Y LA DE OTRAS LOCALIDADES DE LA AMAZONÍA PERUANA UTILIZANDO LOS MARCADORES REPORTADOS POR KARUNAWEEERA.....	5
TABLA 7: COMPARACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA (HE) DE SANTA EMILIA Y LA DE OTROS PAÍSES UTILIZANDO LOS MARCADORES REPORTADOS POR KARUNAWEEERA.....	5
TABLA 8: COMPARACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA (HE) DE SANTA EMILIA Y LA DE OTROS PAÍSES UTILIZANDO LOS MARCADORES REPORTADOS POR IMWONG.....	5

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo explorar la genética poblacional de *Plasmodium vivax* en la comunidad de Santa Emilia (Iquitos, Loreto), una comunidad aislada en medio de la Amazonía Peruana. Para ello, se realizó un seguimiento de un año a un total de 213 habitantes de la comunidad, a partir de los cuales se seleccionaron 103 muestras, y se identificó una elevada proporción de infecciones asintomáticas (74%) y no detectables por microscopía (72%). A pesar del aislamiento geográfico, la diversidad genética encontrada en Santa Emilia ($He=0.61$) fue comparable con la reportada en otras localidades de la Amazonía que presentan menores restricciones de flujo génico. No obstante, también se encontró niveles significativos de desequilibrio de ligamiento ($I^S_A=0.19$, $p<0.001$). Diversos análisis de estructuración y diferenciación genética revelaron la presencia de 4 subpoblaciones de *P. vivax* en Santa Emilia, y a su vez se detectó la ocurrencia de expansiones clonales. Además, como en muchas otras comunidades, se identificó que las actividades económicas juegan un rol determinante en el mantenimiento de los niveles de diversidad genética y el modelamiento de la estructuración poblacional del parásito. Los hallazgos de este estudio sugieren que Santa Emilia representaría un riesgo importante para la reintroducción y mantenimiento de la malaria en otras localidades de la Amazonía Peruana, por lo cual sería necesario la implementación de estudios a mayor escala y la combinación de distintas estrategias para el control de la enfermedad.

Palabras clave: Malaria, *Plasmodium vivax*, microsatélites, diversidad genética, estructuración genético-poblacional, Amazonía Peruana.

ABSTRACT

This work aimed to explore the population genetics of *Plasmodium vivax* in Santa Emilia (Iquitos, Loreto), an isolated community located in the Peruvian Amazon. A one-year follow-up was carried out in 213 individuals, detecting a high proportion of asymptomatic infections (74%), and infections not detected by microscopy (72%). Despite geographic isolation, the genetic diversity found in Santa Emilia ($He=0.61$) was comparable to that reported in Amazonian localities with less gene flow restrictions. Nonetheless, significant linkage disequilibrium ($I^S_A=0.19$, $p<0.001$) was also found. Different population structure and genetic differentiation analyses revealed the presence of 4 subpopulations of *P. vivax* in Santa Emilia. The occurrence of clonal propagation was detected as well. Furthermore, as in many other communities, we identified the critical role of economic activities in sustaining the genetic diversity levels and modeling the parasite population structure. These findings suggest that Santa Emilia may represent an important risk for the reintroduction and maintenance of malaria in other localities of the Peruvian Amazon, highlighting the need to scale-up this type of studies and combine different strategies for malaria control.

Keywords: Malaria, *Plasmodium vivax*, microsatellites, genetic diversity, population structure, Peruvian Amazon.

1. INTRODUCCIÓN

Plasmodium vivax (Grassi & Feletti 1890) es el principal causante de malaria fuera del continente africano (Mendis *et al.* 2001) y se estima que amenaza aproximadamente al 40% de la población mundial (Price *et al.* 2007). En el Perú se reportaron 55 904 casos de malaria durante el año 2016, de los cuales aproximadamente el 73% fueron causados por *P. vivax* (40 696 casos) y el 27% por *P. falciparum* (15 208 casos). La Amazonía es la región más afectada del país, especialmente el departamento de Loreto, el cual presentó el 97% de la totalidad de casos nacionales (Dirección General de Epidemiología 2016).

En la Amazonía Peruana se ha reportado la aparición de infecciones recurrentes de *P. vivax* después de recibir tratamiento con drogas antimaláricas (Ruebush *et al.* 2003; Graf *et al.* 2012), así como una frecuente ocurrencia de infecciones asintomáticas y/o no detectables por microscopía (Roshanravan *et al.* 2003; Branch *et al.* 2005; da Silva-Nunes *et al.* 2012), lo cual hace muy difícil erradicar la malaria vivax de esta región, requiriéndose de esfuerzos constantes y acumulativos. Se necesitan estudios transversales y longitudinales en distintas localidades, que permitan caracterizar la dinámica de la transmisión del parásito en cada población, ya que éstas requieren diferentes estrategias de control. Tal muestreo debe incluir no solo a pacientes sintomáticos captados en localidades que cuentan con centros de salud implementados, sino también a personas asintomáticas o que viven en áreas de difícil acceso, donde la probabilidad de recibir tratamiento médico es menor (Chenet 2014).

Asimismo, al caracterizar la dinámica de transmisión en cada una de las poblaciones, no se debe emplear estrategias basadas únicamente en diagnóstico,

pues estas no proveen información suficiente para entender tan complejo fenómeno. Distintos estudios destacan la importancia de integrar las métricas de monitoreo y estrategias de control de la enfermedad, con métodos de genotipificación que permitan obtener un mapa preciso de los focos de transmisión y de los genotipos circulantes del parásito, para así estimar su persistencia y concentración en áreas específicas o grupos de personas (Arnott, Barry, y Reeder 2012; Chenet 2014; Escalante *et al.* 2015). Asimismo, conocer la historia demográfica del parásito posibilita inferir cambios en su tamaño efectivo poblacional, para así evaluar la efectividad de los programas de control y erradicación (Escalante *et al.* 2015). De manera adicional, los estudios genético-poblacionales permiten discernir entre casos domésticos e importados, así como diferenciar las nuevas infecciones de los relapsos y las recrudescencias (Nyachieo *et al.* 2005; Greenhouse *et al.* 2006; Orjuela-Sánchez *et al.* 2009; Restrepo *et al.* 2011; Arnott, Barry, y Reeder 2012)

Sin embargo, el desarrollo de este plan dentro de la Amazonía Peruana requiere de un conocimiento extenso de la estructura poblacional subyacente dentro de cada localidad, la cual es usualmente desconocida *a priori*. Además, resalta la importancia de la implementación de estudios pilotos. Dichos trabajos permiten evaluar la variabilidad de los marcadores moleculares a utilizar en distintas áreas de estudio, de tal modo que se pueda determinar el número y características de los *loci* requeridos para evaluar diferentes escenarios epidemiológicos, por ejemplo, discriminar entre distintos *clusters* de parásitos, o identificar *clonas* individuales dentro del mismo *cluster* (Chenet 2014; Escalante *et al.* 2015).

Teniendo en cuenta las premisas anteriores, el presente trabajo tuvo como objetivo principal estudiar la diversidad genética y estructura genético-poblacional de *P. vivax* en Santa Emilia, una comunidad aislada geográficamente dentro de la Amazonía Peruana, la cual hasta hace poco había carecido de intervenciones de control y

prevención de la malaria. Para ello, se utilizó un panel combinado entre marcadores microsatélites ya reportados y otros evaluados por primera vez en este estudio. De esta manera se buscó obtener un primer bosquejo del mapa de genotipos circulantes del parásito dentro de esta comunidad, el cual será de mucha utilidad para futuros estudios de mayor alcance. Asimismo, se evaluó si existía alguna relación entre la estructuración genético-poblacional del parásito y las características clínico-epidemiológicas y/o socio-demográficas de los habitantes de la comunidad.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. La malaria y el género *Plasmodium*

La malaria es una enfermedad parasitaria causada por protozoos del género *Plasmodium*, los cuales son transmitidos por la picadura de mosquitos del género *Anopheles*. Este parásito infecta distintos hospederos incluyendo aves, reptiles, roedores y primates (incluyendo al humano). El género *Plasmodium* se encuentra dentro de la Familia Plasmodidae, Orden Haemosporida, Clase Aconoidasida. No obstante, es mayormente conocido por su ubicación dentro del Filo Apicomplexa y el Reino Protista.

Son cinco las especies del género *Plasmodium* capaces de infectar al ser humano: *Plasmodium falciparum* (Welch 1897), *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* (Stephens 1922), *Plasmodium malariae* (Feletti & Grassi 1889) y *Plasmodium knowlesi* (Sinton & Mulligan 1933). Las semejanzas y diferencias entre las características biológicas y las infecciones causadas por cada una de estas especies se encuentran resumidas en la Tabla 1.

El origen de *P. vivax*, según estudios filogenéticos (Escalante *et al.* 1998; Escalante *et al.* 2005), se dio a partir de un parásito malárico de primates no-humanos, probablemente macacos, que cambió de hospedero para infectar humanos. Estos datos son reforzados por estudios basados en el genoma mitocondrial del parásito (Jongwutiwes 2005; Mu *et al.* 2005).

Características	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>P. knowlesi</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. vivax</i>
Tamaño del genoma (Mb)	23.3	24.4	33.6	33.5	29.1
Número de cromosomas	14	14	14	14	14
Número de genes	5 429	5 291	6 540	7 132	6 642
Contenido de GC (%)	19	39	24	29	40
Estadio pre-eritrocítico (días)	5-7	8-9	14-16	9	6-8
Ciclo eritrocítico (días)	48	24	72	50	48
Eritrocitos afectados	Todos	Todos	Maduros	Reticulocitos	Reticulocitos
Parasitemia (por μ L) Promedio Máxima	20 000-500 000 2 000 000	600-10 000 236 000	6 000 20 000	9 000 30 000	20 000 100 000
Paroxismo febril (horas)	16-36 o más	8-12	8-10	8-12	8-12
Malaria severa	Sí	Sí	No	No	Sí
Relapsos causados por estadios hepáticos (hipnozoítos)	No	No	No	Sí	Sí
Recurrencias	Sí (por falla del tratamiento)	Sí	Sí (hasta 30-50 años después de la infección primaria)	No	Sí (por falla del tratamiento)

Tabla 1: Características biológicas y de las infecciones causadas por *Plasmodium falciparum*, *P. knowlesi*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. vivax* (Adaptado de Antinori *et al.* 2012 y Rutledge *et al.* 2017).

2.2. Epidemiología de la malaria en el mundo

Se estima que 3.4 billones de personas en el mundo se encuentran en riesgo de infección por malaria, siendo *P. vivax* junto con *P. falciparum* aquellos que generan la mayor tasa de morbilidad y mortalidad (WHO 2016). La Fig. 1 muestra las distintas zonas del mundo donde la malaria ha sido endémica durante las dos últimas décadas.

Entre estas dos especies, *P. vivax* es la que presenta poblaciones parasitarias más diversas genéticamente y con menor grado de estructuración, lo cual indicaría un origen más antiguo (Cornejo y Escalante 2006; Liu *et al.* 2014), así como una menor susceptibilidad a eventos de reducción poblacional (cuellos de botella) y mayor eficiencia en la diseminación de sus genes (Barry *et al.* 2015). Esto explicaría en gran medida la mayor resiliencia de *P. vivax* a los esfuerzos de control de malaria, siendo la especie, entre aquellas capaces de infectar humanos, con mayor distribución en el mundo (Diermissen y Yaeger 2008).

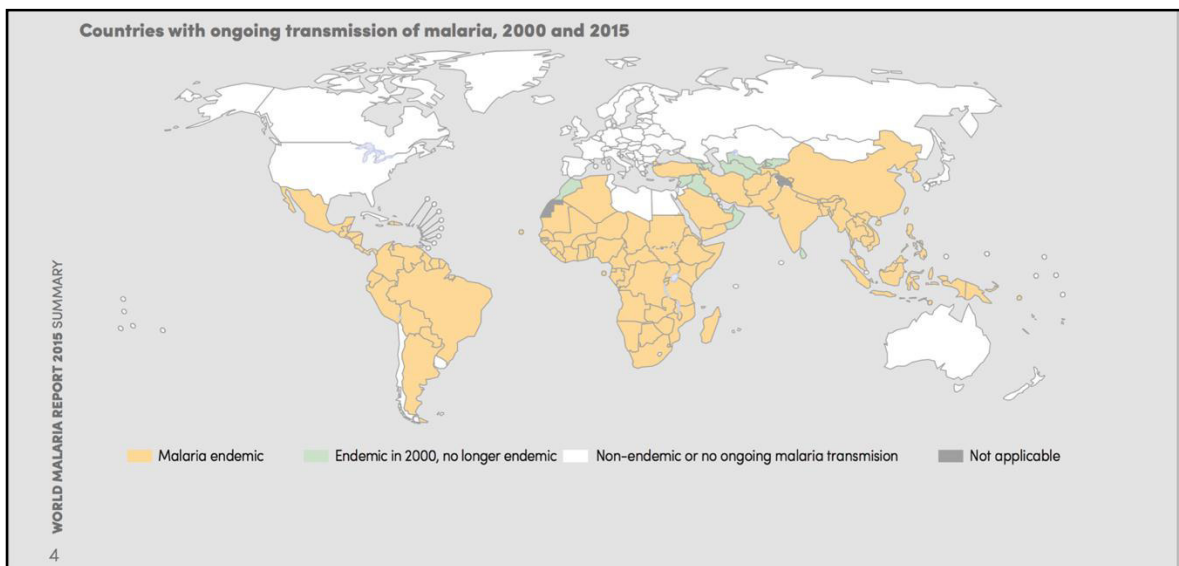


Figura 1: Endemicidad de la malaria a nivel mundial entre los años 2000 y 2015 (Tomado de WHO 2015).

En América Latina, la transmisión de malaria ocurre principalmente en 6 países (Brasil, Colombia, Guyana, Haití, Perú y Venezuela) y cerca de 132 millones de personas se encuentra en riesgo de infección (WHO 2016). En Colombia, la malaria causada por *P. vivax* es la de mayor prevalencia, correspondiendo frecuentemente al 65 a 70% de los casos (Carmona-Fonseca, Álvarez, y Blair 2006); mientras que en Brasil la proporción de infecciones por *P. vivax* normalmente oscila alrededor del 80% (Souza-Neiras, Melo, y Machado 2007).

2.3. Epidemiología de la malaria en el Perú

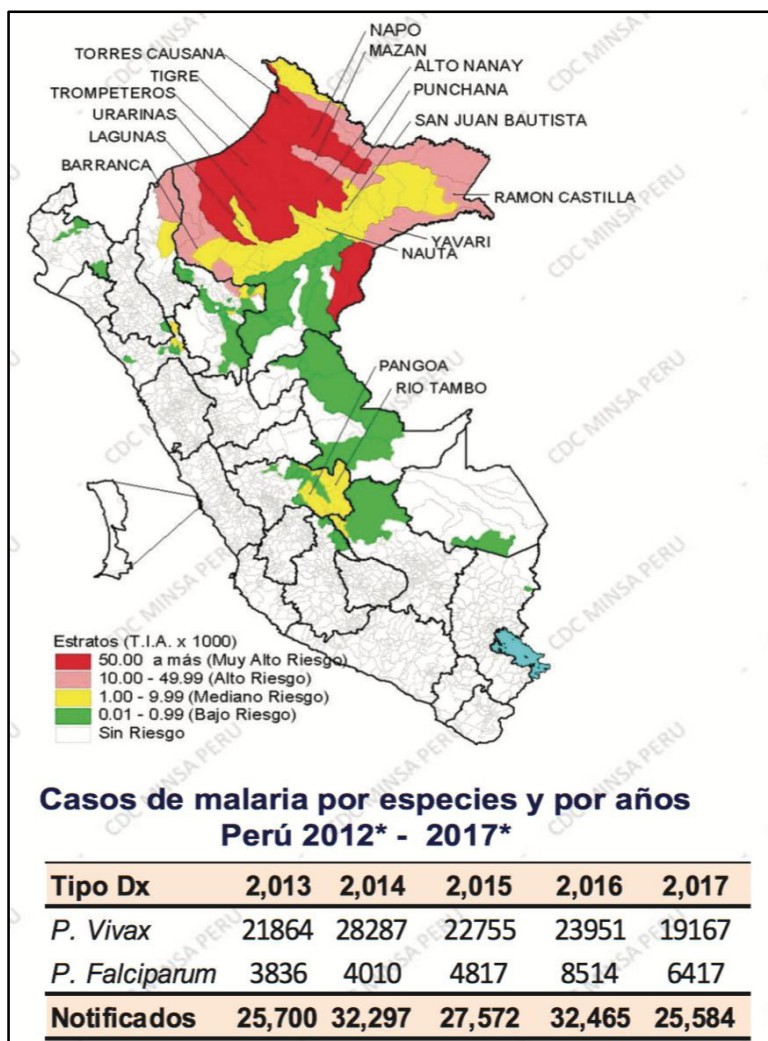


Figura 2: Mapa de riesgo de malaria por *P. vivax* en el Perú (Tomado de la DGE-SE27, 2017).

En el caso de Perú, la malaria es endémica de algunas zonas de la costa norte y posee una distribución importante en la Región Amazónica, siendo el departamento de Loreto el más afectado. En la Amazonía Peruana, la enfermedad presenta una transmisión mayormente estacional, con picos de noviembre a mayo; y en el caso de la costa norte, de abril a junio (Dirección General de Epidemiología 2009). Si bien,

tanto *P. vivax* como *P. falciparum* son responsables de la transmisión de malaria en la cuenca amazónica (Perú y Brasil), aproximadamente el 77% de las infecciones son atribuidas a *P. vivax* (PAHO 2009).

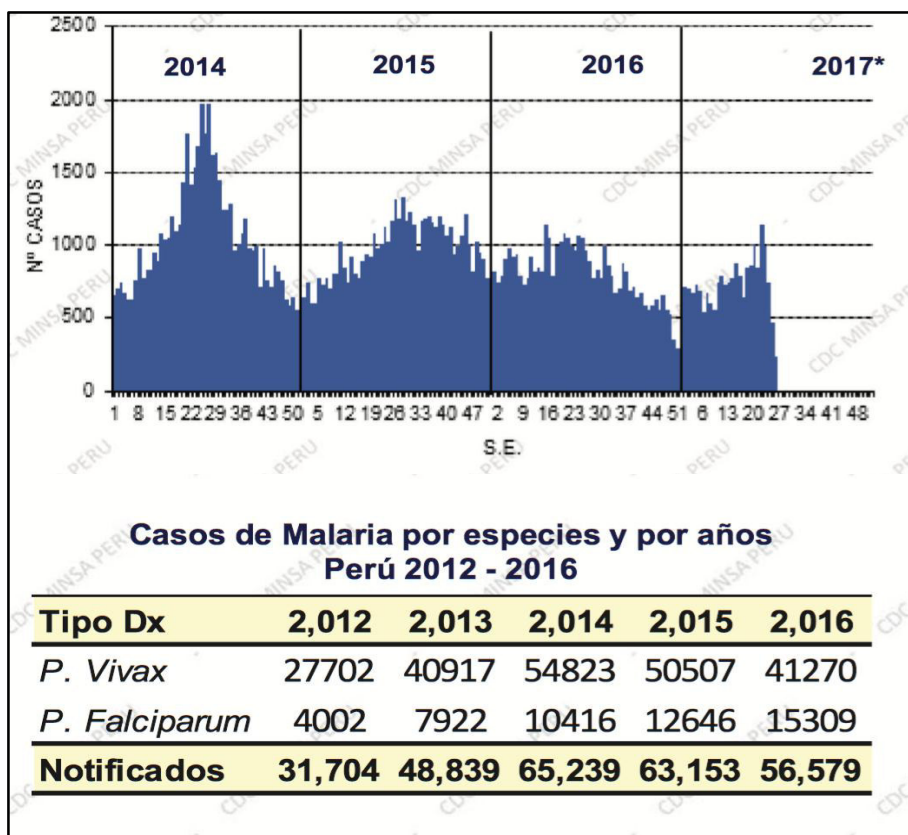


Figura 3: Casos de malaria por *P. vivax* en el Perú en los últimos años (Tomado de la DGE-SE27, 2017).

En el Perú, la transmisión de la malaria presenta una serie de determinantes que aumentan el riesgo de contraer la enfermedad. Entre estos factores destaca el clima cálido, ya que por debajo de 16 °C los parásitos cesan su desarrollo en el mosquito. Las mejores condiciones para el desarrollo del parásito en el vector son temperaturas en un rango de 20-30 °C y humedad relativa mayor a 60% (Aramburú Guarda, Ramal Asayag, y Witzig 1999). Además de presencia de lluvias, viviendas sin protección, alta tasa de migración hacia zonas de mayor transmisión y viceversa, y en general, alteración del medio ambiente por parte del hombre (construcción de

represas, de estanques, cambios en los cursos de agua, etc.). Todos estos factores contribuyen a la creación de nuevos hábitats larvales que incrementan el riesgo de transmisión de malaria (Aramburú Guarda, Ramal Asayag, y Witzig 1999; Vargas Herrera 2003; Dirección General de Epidemiología 2009).

2.4. Biología de *Plasmodium vivax*

El ciclo de vida de las especies de *Plasmodium* causantes de malaria en humanos es muy similar, sin embargo, existen características particulares para cada uno de ellas (Antinori *et al.* 2012) (Tabla 1). Tanto en *P. vivax* como en el resto de especies, el ciclo de vida involucra 2 hospederos: la hembra del mosquito *Anopheles*, como hospedero definitivo, y un hospedero intermediario que puede ser un humano u otro vertebrado (Fig. 4). El ciclo inicia cuando el mosquito infectado pica a un hospedero intermediario para alimentarse, e inocular parásitos en forma de esporozoitos en su torrente sanguíneo (Mueller *et al.* 2009).

Tras haber ingresado al torrente sanguíneo, los esporozoitos migran hacia el hígado (estadios exoeritrocíticos), donde se multiplican asexualmente formando esquizontes hepáticos (Mueller *et al.* 2009). En el caso de *P. vivax* y *P. ovale*, los esporozoitos pueden diferenciarse en un estadio latente llamado hipnozoito, el cual puede ser reactivado después de meses o años retomando el proceso infeccioso (Mueller *et al.* 2009; Antinori *et al.* 2012). (Fig. 4, Tabla 1). Los determinantes biológicos de la reactivación de los hipnozoitos aún no se comprenden completamente aún (Mueller *et al.* 2009).

Posteriormente, el equizonte hepático se rompe en el hepatocito, lo que lleva a la aparición de un nuevo estadio, el merozoito. Este estadio puede reinfectar a los

hepatocitos o volver al torrente sanguíneo e infectar a los glóbulos rojos (Mueller *et al.* 2009). Tanto *P. vivax* como *P. ovale* solo infectan reticulocitos, mientras que *P. malariae* solo invade eritrocitos maduros (Antinori *et al.* 2012) (Tabla 1). Ya en los reticulocitos, los merozoitos se nutren del componente proteico de la hemoglobina, diferenciándose en nuevo estadio: el trofozoito. Los trofozoitos se multiplican asexualmente en el interior de dichas células, formándose el esquizonte hemático (estadio eritrocítico) (Mueller *et al.* 2009).

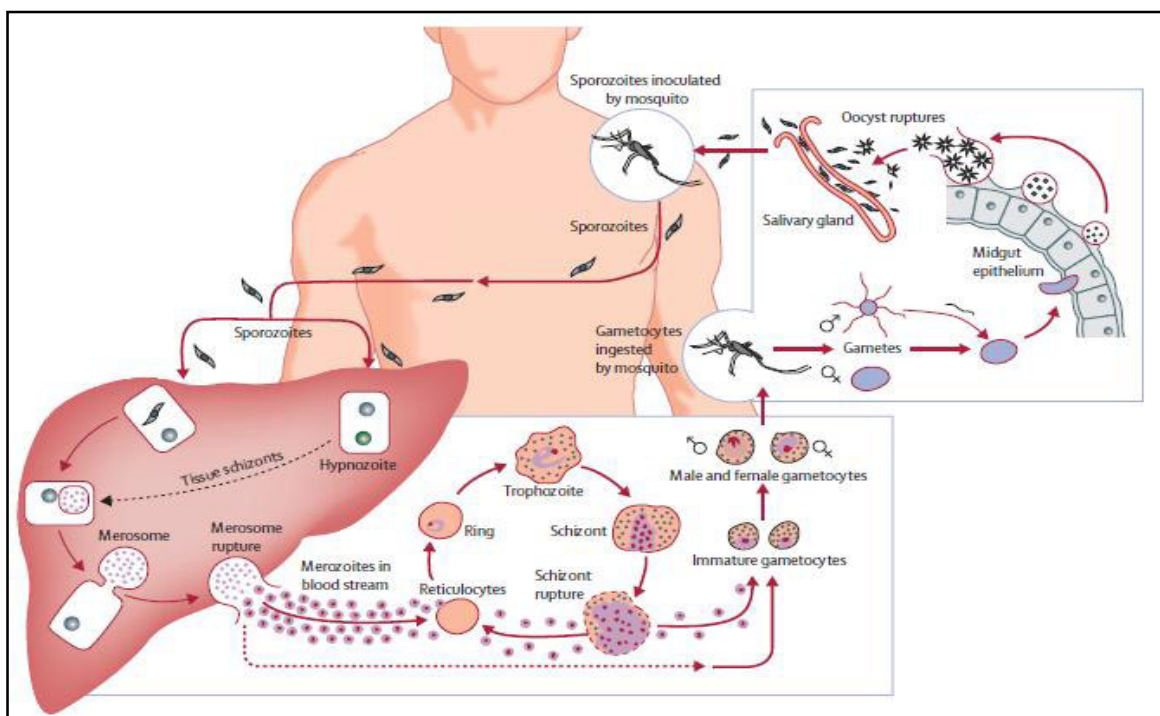


Figura 4: Ciclo de vida de *P. vivax* (tomado de Mueller *et al.* 2009).

A partir de este punto, el ciclo de vida de *P. vivax* y el de las otras especies ya no presentan diferencias (Antinori *et al.* 2012). Al concluir la maduración del esquizonte se da la lisis del eritrocito, liberando nuevos merozoitos. La mayoría de estos continúan con el ciclo replicativo, infectando nuevos eritrocitos (solo reticulocitos en el caso de *P. vivax*), mientras que algunos se convierten en gametocitos masculinos y femeninos. Si el individuo infectado es nuevamente picado por un mosquito,

los gametocitos masculinos y/o femeninos pueden ser ingeridos por el mosquito, en donde se diferencian en gametos y al fusionarse producen los cigotos (reproducción sexual). Los cigotos se convierten en oocinetos, los que invaden las células intestinales del mosquito, donde se desarrollan en ooquistes, crecen, se rompen y liberan nuevos esporozoitos, que hacen su camino hacia las glándulas salivares del mosquito (Mueller *et al.* 2009).

Otro aspecto importante de la biología de *P. vivax* es que su genoma consta de 29.1 Megabases distribuidos en 14 cromosomas lineares de 1.2 a 3.5 Mb de longitud. Consta de aproximadamente 6 642 genes y presenta un contenido de guaninas y citosinas (G + C) de 40%. Su tamaño y cantidad de genes son mayores a los del genoma de *P. falciparum* (Rutledge *et al.* 2017).

2.5. Métodos de diagnóstico de malaria

Durante décadas, el método rutinario para la detección y diferenciación de parásitos del género de *Plasmodium* ha sido la evaluación microscópica de gota gruesa y frotis sanguíneo teñido con Giemsa (Kain *et al.* 1998; Moody 2002), la cual es considerada como la prueba “*gold standard*” (prueba de oro) para el diagnóstico de malaria en América Latina (WHO 2017). Efectivamente, el Ministerio de Salud del Perú aún basa sus estrategias de detección y control de malaria en el diagnóstico por la técnica de microscopía (Ministerio de Salud 2007).

Sin embargo, numerosos estudios han reportado la baja sensibilidad de esta técnica. Incluso para microscopistas con amplia experiencia es difícil detectar la presencia de *Plasmodium spp.* en muestras con baja parasitemia, así como diferenciar entre distintas especies en casos de infecciones mixtas (Payne 1988; Kain *et al.* 1998;

Hänscheid y Grobusch 2002; Moody 2002). En este contexto, han surgido otras alternativas para la detección de malaria como el diagnóstico inmunocromatográfico y el diagnóstico molecular a partir de PCR (Moody 2002).

De entre todas las técnicas mencionadas anteriormente, el diagnóstico por PCR es aquel que ha demostrado poseer una mayor sensibilidad y mejor capacidad de discriminación entre especies para realizar un adecuado diagnóstico de malaria (Hänscheid y Grobusch 2002; Patsoula *et al.* 2003). Además, el desarrollo del PCR en tiempo real (qPCR) incrementó la eficiencia y sensibilidad aún más (Lee *et al.* 2002; de Monbrison *et al.* 2003), permitiendo cuantificar parasitemias y extendiendo el límite de detección hasta 0.5 - 1 parásito/ μ L (Mangold *et al.* 2005; Tran *et al.* 2014). Asimismo, esta última tecnología permitió la reducción del tiempo necesario para la realización del diagnóstico molecular (Lee *et al.* 2002; de Monbrison *et al.* 2003).

2.6. Marcadores moleculares y aplicación de la genética de poblaciones en el estudio de la malaria causada por *P. vivax*

Los marcadores moleculares son una fuente de información utilizada por la genética de poblaciones para evaluar la diversidad genética, estructuración poblacional, historia demográfica, e incluso dilucidar aspectos filogeográficos (Broquet y Petit 2009) de distintos organismos, incluyendo a aquellos que son patógenos (de Meeûs *et al.* 2007). Existe una gran variedad de marcadores moleculares utilizados en estudios genético-poblacionales como son los SNPs, RAPDs, RFLPs, AFLPs, microsatélites, etc (de Meeûs *et al.* 2007). Las ventajas y desventajas de cada uno de estos marcadores son discutidas de manera extendida por numerosos investigadores (Roderick 1996; Caterino, Cho, y Sperling 2000; Sunnucks 2000).

La estructura poblacional y el sistema de reproducción de los patógenos son fenómenos biológicos fuertemente asociados y esto tiene importantes implicancias en la epidemiología de las enfermedades transmisibles (Tibayrenc y Ayala 2002). Conocer estos aspectos de la biología de un patógeno es importante para la toma de decisiones en el manejo de enfermedades (Milgroom 1996), enfocar la investigación correspondiente a tratamiento y prevención (Taylor *et al.* 1999), así como para evaluar y predecir la aparición de resistencia a drogas (Tibayrenc 1999).

P. vivax no es ajeno a esta descripción. La gran dificultad para controlarlo sugiere que este parásito posee una gran capacidad de mantener su transmisión, incluso ante los constantes esfuerzos e intervenciones antimaláricas (Barry *et al.* 2015). Uno de los factores fundamentales que gobiernan la transmisión y la naturaleza resiliente de *P. vivax* es la diversidad genética de este parásito, por lo cual es esencial generar un mapa local y global de su estructura genético-poblacional antes de establecer estrategias adecuadas para el control y la eliminación de la malaria vivax (Arnott, Barry, y Reeder 2012).

Entender la diversidad genética y estructura poblacional de *P. vivax* es clave para predecir la emergencia y dispersión de fenotipos de interés como nuevas variantes antigénicas o la resistencia a drogas (Escalante *et al.* 2015). También es esencial para distinguir entre distintas clonas dentro de una misma infección, así como entre infecciones, lo cual es útil no sólo para estudios epidemiológicos, sino que podría tener mayores implicancias en la salud pública (Arnott, Barry, y Reeder 2012). Un ejemplo de esto es que niveles mayores o crecientes de infecciones policlonales de *P. vivax* podrían llevar a un incremento en la virulencia o *fitness* del parásito, ya que las distintas clonas pueden competir por los recursos dentro del hospedero y por la supervivencia ante intervenciones antimaláricas (Havryliuk y Ferreira 2009).

Escalante *et al.* (2015), hacen un repaso de otras aplicaciones de los métodos de genotipificación para el estudio de malaria, como, por ejemplo, el monitoreo de la dinámica de infección por distintas clonas a lo largo del tiempo, evaluación del flujo génico debido a la migración (para identificar rutas de transmisión), detección de cambios en la multiplicidad de infección (MOI) y/o diversidad genética del parásito de acuerdo a cambios en la intensidad de transmisión, entre otros.

2.7. Microsatélites como marcadores para estudiar la genética poblacional de *P. vivax*

La investigación en diversidad genética y genética poblacional necesita de marcadores moleculares informativos, y esto depende principalmente de su variabilidad (polimorfismo), por lo que los microsatélites ofrecen una buena alternativa para estos estudios. Los microsatélites son secuencias cortas de ADN repetidas en tándem, generalmente de 2 a 5 pares de bases, cuyo polimorfismo consiste en la variación en el número de repeticiones de la secuencia que puede haber de un individuo a otro (Tautz 1989). Se caracterizan por ser altamente polimórficos, codominantes, selectivamente neutros, abundantes en el genoma y relativamente fáciles de anotar (Lehmann *et al.* 1996; Goldstein y Schlotterer 1999).

Además de ser usados para estudiar la genética poblacional de un organismo, debido a su alto polimorfismo, los microsatélites son marcadores moleculares deseados para múltiples propósitos: *fingerprinting*, identificación parental, mapeo genético, conservación, entre otros (Bhargava y Fuentes 2010; Buschiazzo y Gemmell 2006; Chistiakov, Hellemans, y Volckaert 2006; Guichoux *et al.* 2011). Sin embargo, hay que resaltar que su uso es mayormente apropiado para estudiar eventos evolutivos recientes entre subpoblaciones de una misma especie, o entre

especies estrechamente relacionadas (Goldstein y Pollock 1997; Schlötterer 2001; Tsitrone, Rousset, y David 2001; Ljungqvist, Kesson, y Hansson 2010)

Durante varios años existió mucho menos información sobre la genética poblacional de *P. vivax* que sobre la de *P. falciparum*, debido principalmente a la poca disponibilidad de marcadores. Sin embargo, el aumento progresivo del interés por los estudios genético-poblacionales conllevó a la reciente implementación de aproximadamente 240 marcadores microsatélites para estimar la MOI y/o caracterizar la estructura poblacional de *P. vivax* (Barry *et al.* 2015).

Estudios en otros países han demostrado un alto grado de variabilidad genética de este parásito utilizando diferentes paneles de microsatélites. Sin embargo, la comparación es complicada, pues es difícil determinar cuánto de la variación depende del panel de marcadores y cuánto depende exclusivamente de la diversidad genética de las poblaciones estudiadas (Brito y Ferreira 2011). Sutton (2013) hace una caracterización detallada de 42 microsatélites de frecuencias conocidas en distintas áreas endémicas y proporciona pautas para su uso en la determinación de MOI, diversidad genética, y estructura poblacional. El uso de los mismos marcadores en distintas zonas de transmisión facilita la comparación directa de resultados (Barry *et al.* 2015), y este estudio empleará 9 de estos marcadores ya conocidos, para explorar su diversidad en una comunidad nunca antes evaluada.

Durante la última década, diversos estudios han hecho uso principalmente de un grupo de marcadores descritos por Karunaweera *et al.* (2006) y por Imwong *et al.* (2007). Estos han permitido describir una alta heterocigosidad ($He = 0.79$) y una fuerte diferenciación poblacional ($Fst = 0.4 - 0.7$) en Colombia (Imwong, Nair, *et al.* 2007), así como una alta diversidad genética en Brasil (Ferreira *et al.* 2007) y Vietnam (Van den Eede, Erhart, *et al.* 2010) definida por valores de heterocigosidad

de 0.80 y 0.86 respectivamente. En el caso de Perú, de manera similar se han encontrado niveles variables de diversidad a partir de estos marcadores (Van den Eede, Van der Auwera, *et al.* 2010; Van den Eede *et al.* 2011; Delgado-Ratto *et al.* 2014, Delgado-Ratto *et al.* 2016), los cuales son discutidos con los resultados de este trabajo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Analizar la diversidad genética y estructura genético-poblacional de *Plasmodium vivax* en la comunidad de Santa Emilia (Iquitos, Loreto).

3.2. Objetivos específicos

- Identificar, por seguimiento mensual y durante el periodo marzo 2013 - febrero 2014, las infecciones por *P. vivax* en la comunidad a partir de diagnóstico por qPCR.
- Determinar el nivel de variabilidad de 16 marcadores microsatélites y evaluar la diversidad genética de la población parasitaria presente.
- Evaluar la estructuración genético-poblacional subyacente de *P. vivax* en la comunidad y su asociación con características epidemiológicas de los habitantes de la comunidad.

4. HIPÓTESIS

Existe una asociación entre la estructuración genético-poblacional de *Plasmodium vivax* y las características epidemiológicas de los habitantes de Santa Emilia.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Consentimiento ético

Las muestras utilizadas fueron obtenidas en un estudio previo de cohorte realizado en esta comunidad por el Laboratorio de Malaria (LID-UPCH) que ya cuenta con aprobación del Comité de Ética de la UPCH: "Transmisión de la malaria en comunidades lejanas de la Región Amazónica del Perú: Fase I", Código SIDISI: 60429 (Anexo 1). Los pacientes incluidos en el estudio cuentan con consentimiento informado por escrito según las Normas del Código de Ética y Bioseguridad, y todos los procedimientos fueron realizados siguiendo los lineamientos establecidos en la Declaración de Helsinki.

5.2. Área y población de estudio

Este estudio fue llevado a cabo en la comunidad de Santa Emilia (latitud 4°11'45.25" S, longitud 74°12'36.96" O, altitud 107m), distrito de Nauta, provincia de Loreto, departamento de Loreto, en la Amazonía Peruana. La población de Santa Emilia es predominantemente mestiza y muy pobre, y la economía local depende de la agricultura, extracción de madera, pesca y pequeñas actividades.

Esta comunidad se encuentra retirada y es de difícil acceso tanto para el personal del Ministerio de Salud (cuando realiza intervenciones de control de la enfermedad) como para los investigadores. Para llegar a ella se debe recorrer un tramo de 98 km a través de la carretera Iquitos-Nauta y luego 144 km desde Nauta por vía fluvial a través del río Marañón - río Tigre - quebrada Nahuapa (Fig. 5).

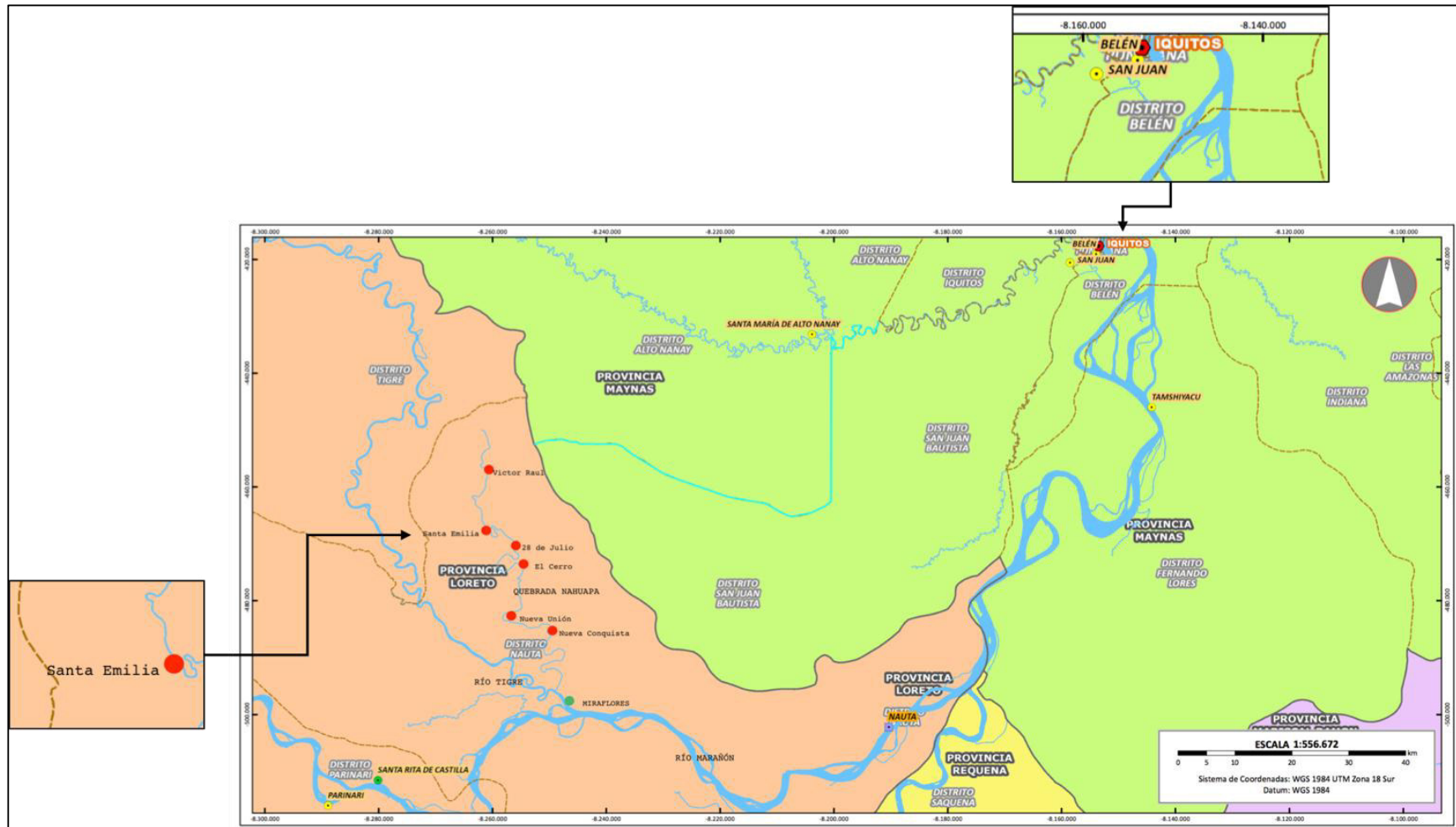


Figura 5: Ubicación de la comunidad de Santa Emilia en el departamento de Loreto

La larga distancia, más la irregularidad del transporte a nivel fluvial, hacen de Santa Emilia una comunidad aislada geográficamente en la Amazonía Peruana, y debido a esto, hasta el año 2013 no se habían realizado intervenciones para controlar la malaria. Ese mismo año se inició este estudio por parte de la Universidad Peruana Cayetano Heredia dentro del proyecto “Transmisión de la malaria en comunidades lejanas de la Región Amazónica del Perú: Fase I”. Sin embargo, se hizo frente a varias limitantes. En la comunidad no hay fluido eléctrico por lo que debió contarse con un grupo electrógeno y combustible para el uso del microscopio. Además, a pesar de que las personas se mostraron dispuestas a colaborar, constantemente salían de la comunidad y recorrían largas distancias para trabajar (o incluso pernoctar) en sus chacras; además de viajar a Nauta regularmente para la venta de sus productos. Dentro de este estudio se contó con el apoyo de una persona que permanecía en la localidad y se encargaba de hacer el diagnóstico por microscopía a toda la comunidad, así como suministrar el tratamiento correspondiente. No obstante, fue difícil cumplir el régimen de tratamiento con los pacientes asintomáticos debido a que no se perciben enfermos y no aceptan recibirlo.

5.3. Diseño muestral del estudio

El presente fue un estudio retrospectivo basado en una cohorte poblacional que se realizó en forma conjunta con la Dirección Regional de Salud de Loreto (DRSL) en la comunidad de Santa Emilia, como parte del proyecto “Transmisión de la malaria en comunidades lejanas de la Región Amazónica del Perú: Fase I” de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

La recolección de datos se dio en el año 2013, durante el censo que constituyó la primera fase de este proyecto. Cada participante proporcionó el consentimiento

informado antes de participar en el estudio y se le administró un cuestionario estructurado para recopilar información socio-demográfica (edad, sexo, nivel educativo), factores socioeconómicos, características del hogar, situación migratoria, historial de malaria, tratamiento reciente y las características de prevención de la malaria. A cada individuo se le dio un código único alfanumérico de siete caracteres combinando el sitio, los hogares y código individual.

Posteriormente se procedió con la implementación de 2 estrategias de vigilancia para la detección de casos: Detección activa de casos (DAC) y Detección pasiva de casos (DPC). La estrategia de DAC consistió en la toma de muestra a todos los participantes en 15 ocasiones durante un periodo de un año, en los días 1, 7, 14, 21, 28, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300 y 330 (considerando como día 1 el día siguiente al término del censo) (Fig. 6). En cada DAC se visitó todas las casas de la comunidad, se realizó microscopía diagnóstica a todos los miembros de la familia, y solo a los positivos se les dio tratamiento, independiente de la presencia de síntomas, de acuerdo a las normas nacionales. En cada DAC el equipo de investigación que acompañó la intervención pidió proporcionar una muestra de sangre adicional a partir de pinchazo de dedo recogida sobre papel de filtro (Whatman grado 3, Whatman, Springfield Mill, EE.UU.), para su posterior procesamiento por qPCR en el Laboratorio Satélite de Iquitos, y así identificar los parásitos no detectados por microscopía. La estrategia de DPC consistió en realizar diagnóstico por microscopía a todas las personas que atendieron a los establecimientos de salud de la jurisdicción a causa de síntomas maláricos, y la aplicación de tratamiento se dio solo a los positivos, de manera similar a la estrategia anterior. Además, de manera similar a la DAC, también se obtuvo una muestra de sangre en papel filtro para realizar el diagnóstico por qPCR.

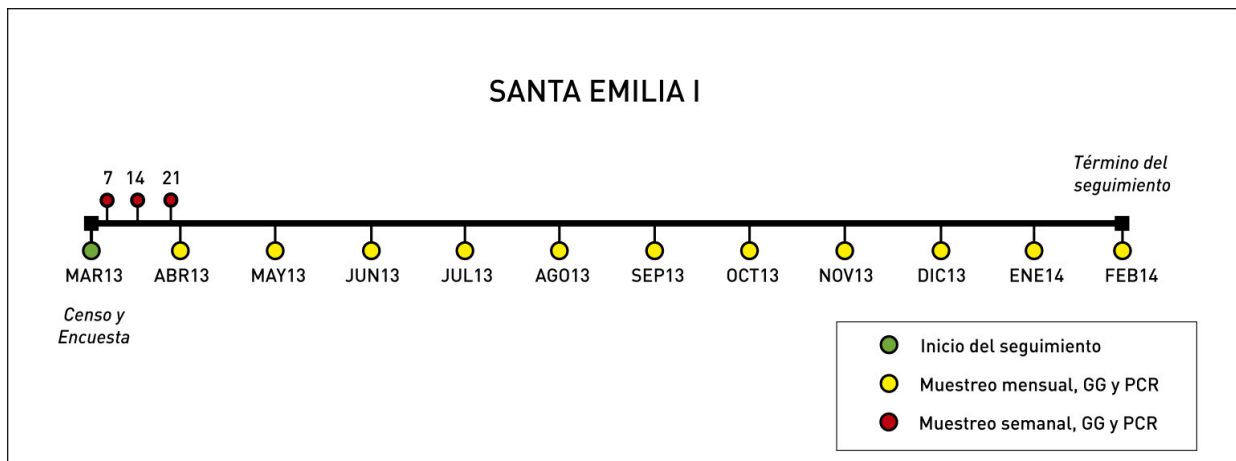


Figura 6: Diseño muestral del estudio en la comunidad de Santa Emilia

5.4. Selección de marcadores

En este estudio se utilizaron 3 distintos paneles de marcadores microsatélites: 5 marcadores reportados por Karunaweera *et al.* (2006), 4 marcadores reportados por Imwong *et al.* (2007) y 7 marcadores que no han sido previamente reportados. Estos últimos se encuentran en ligamiento físico y fueron identificados y diseñados en base al genoma de la cepa referencial Sal1. En el Anexo 2 se muestra la lista de *primers* para la amplificación de microsatélites de *P. vivax*. Con respecto a los marcadores previamente reportados, estos fueron seleccionados debido a que permiten individualizar cada muestra y discriminar entre muestras mono y policlonales (Imwong 2006; Karunaweera *et al.* 2006).

5.5. Selección de muestras

Las muestras que fueron positivas para *P. vivax* según el diagnóstico por qPCR realizado por el Laboratorio Satélite de Iquitos fueron seleccionadas para ser enviadas a Lima, donde se realizaron todos los procedimientos siguientes. Como

paso siguiente, se excluyó a todas las muestras en las que se detectó bajas parasitemias ($Cq > 33.5 \equiv 1.34$ moléculas/uL o menos) así como aquellas que por diversos motivos no llegaron a Lima (Fig. 7).

Antes de proceder a realizar la genotipificación por microsatélites, se repitió la extracción de ADN y el qPCR para todas las muestras seleccionadas hasta este punto. De esta manera, se buscó reducir el efecto de la degradación de ácidos nucleicos causada por un almacenamiento prolongado. Además, para evitar la sobrerrepresentación de haplotipos por efecto del re-muestreo, cuando un paciente presentó más de una infección en un mismo mes, se seleccionó aquella con la mayor parasitemia (menor Cq) y se excluyó a las restantes (Fig. 7).

5.6. Procedimientos de laboratorio

5.6.1 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN de las muestras se utilizó el método de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico 25:24:1 (Sambrook y Green 2012). El ADN fue extraído a partir de aproximadamente 6 mm² de papel filtro con sangre seca. El procedimiento consistió de los siguientes pasos: Se agregaron 250 µL de *buffer* TEN 2X (0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 1 M NaCl), 50 µL de SDS (Dodecilsulfato sódico) al 10%, 20 µL de Proteinasa K (Qiagen) y 180 µL de H₂O ultrapura a un tubo de 1.5 mL conteniendo el papel filtro con sangre. Seguidamente se mezcló en un vórtex e incubó a 56 °C por 1 hora con agitación constante. Posterior a la incubación, se agregó 500 µL de la mezcla Fenol/Cloroformo/Alcohol isoamílico (25:24:1) (Sigma), se agitó vigorosamente y se centrifugó por 5 minutos a 13 000 x g. Se retiró la fase acuosa y se pasó a un nuevo tubo. A continuación se agregó 500 µL de Cloroformo/Alcohol isoamílico (24:1), se mezcló nuevamente en un vortex, se

centrifugó por 5 minutos a 13 000 x g y se retiró la fase acuosa a un nuevo tubo al que se agregó 1 volumen de etanol absoluto, 0.2 volúmenes de acetato de sodio 3M (pH 5.2) y se incubó por 16 horas a 4 °C. Terminada la incubación, se centrifugaron los tubos a máxima velocidad (18 000 x g) por 15 minutos; se descartó el sobrenadante por inversión y se dejó secar por 2 minutos en papel toalla, luego se agregó 1 mL de etanol al 70%, se mezcló levemente y se centrifugó a máxima velocidad por 15 minutos. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se dejó secar a 65 °C por alrededor de 5 minutos, o hasta que se evapore el etanol completamente. Finalmente, se resuspendió el ADN en *buffer* TE (10 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA pH 8.0) en un volumen de 50 µL.

5.6.2 Diagnóstico y cuantificación de ADN

Se realizó el diagnóstico y cuantificación de ADN de *P. vivax* presente en las muestras extraídas a partir de qPCR, utilizando como objetivo de amplificación el gen ARNr 18s (Mangold *et al.* 2005). Para esto, se realizó una cuantificación absoluta en base a una curva estándar elaborada a partir del plásmido pGEM-PV-18srRNA y 6 diluciones seriadas de factor 1:10, las cuales son expresadas como número de moléculas por µL: 4×10^5 moléculas/µL (stock), 4×10^4 moléculas/µL, 4×10^3 moléculas/µL, 4×10^2 moléculas/µL, 4×10^1 moléculas/µL, 4×10^0 y 4×10^{-1} moléculas/µL. Cada punto de la curva fue evaluado por triplicado. La reacción de PCR tuvo un volumen de 25 µL que incluyó 5 µL de ADN. Además, contuvo 10U de PerfeCTa® SYBR® Green FastMix® (12.5 µL) y 300 nM de cada primer, completando el volumen con H₂O libre de nucleasas. La amplificación se realizó en un termociclador Real-Time PCR CFX Connect™ Bio-Rad.

5.6.3 Clasificación de muestras y re-amplificación genómica total

Aquellas muestras con un alto número de copias ($Cq < 28.61 \equiv 8$ moléculas/uL) fueron diluidas hasta la concentración de 8 copias/uL para la posterior amplificación de microsatélites. Las muestras clasificadas con mediana parasitemia [$Cq (28.65; 32.91) \equiv (8; 1.5)$ moléculas/uL] fueron reamplificadas mediante el uso del kit *GenomiPhi V2 DNA Amplification*. Antes de proceder a la amplificación de microsatélites, a este grupo de muestras se les realizó una dilución 1:20. Un grupo de muestras clasificadas con baja parasitemia [$Cq (32.98; 34) \equiv (1.5; 0.8)$ moléculas/uL] fueron seleccionadas para ser diluidas añadiéndose H_2O libre de nucleasas hasta obtener un volumen de 100 uL y así poder realizar la amplificación de los 16 microsatélites. El resto de muestras con baja parasitemia ($Cq > 34 \equiv 0.8$ copias/uL o menos) fueron descartadas definitivamente del estudio (Fig. 7).

5.6.4 Amplificación de microsatélites

La amplificación de microsatélites fue realizada mediante PCR convencional después de haber estandarizado la técnica para cada uno de los marcadores. El primer *forward* de cada juego estuvo marcado con un fluoróforo (6FAM, NED, VIC y PET) para que el producto de PCR fuera posteriormente analizado por electroforesis capilar. Las condiciones de PCR adecuadas para cada marcador fueron estandarizadas con experimentos piloto antes de la amplificación de la totalidad de muestras. La reacción de PCR tuvo un volumen de 25 μ L que incluyó 2.5 μ L de ADN. Además, contuvo de 2.5 μ L de 10x PCR Buffer II (Thermo Fisher Scientific™), 1.5mM de $MgCl_2$, 200 μ M de dNTPs, 200 o 400 nM de cada *primer* (Ver Anexo 1), 1U de *AccuPrime Taq DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific™), completando el volumen con H_2O libre de nucleasas. La amplificación se realizó en un termociclador Bio-Rad T100™.

5.6.5 Electroforesis en gel de agarosa

Un grupo de muestras, de distintas parasitemias, fue seleccionado para evaluar los productos de PCR correspondientes a cada marcador, en geles de agarosa al 2%. De esta manera se buscó comprobar la amplificación exitosa y libre de inespecificidades de los PCR microsatélites, antes de evaluar el tamaño de los productos por electroforesis capilar.

5.6.6 Electroforesis capilar

Los productos de PCR marcados con fluoróforos fueron separados por electroforesis en el sistema ABI PRISM 3100 (previa validación del equipo utilizando muestras estándar). El sistema de electroforesis capilar empleado fue GeneScan™ 500 LIZ, el cual está diseñado para medir el tamaño de fragmentos de ADN dentro del rango 35 – 500 nucleótidos y provee 16 fragmentos de hebra simple marcados: 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340, 350, 400, 450, 490 y 500 nucleótidos. La dilución apropiada de los productos de PCR de cada marcador fue estandarizada mediante pilotos antes de analizar la totalidad de muestras.

5.7. Estrategia de análisis

5.7.1 Depuración de los datos

Se utilizó el programa Peak Scanner v1.0 para realizar la depuración de los electroferogramas considerando como un pico verdadero a todo aquel que presentó una fluorescencia relativa mayor a 50 RFUs. Todo pico secundario que fue mayor a un tercio del tamaño del pico principal y mayor a los 50 RFUs también fue considerado como un alelo. Aquellas muestras que presentaron más de un pico o

alelo en un loci determinado fueron consideradas como muestras policlonales, es decir, que existía la presencia de más de una clona de parásitos en la muestra. La presencia de alelos nulos (no amplificación del alelo por PCR) fue reportada para cada marcador.

5.7.2 Análisis de diversidad genética

Los resultados de microsatélites de cada muestra fueron ingresados en una base de datos de Excel, donde el código de cada alelo correspondió al número de repeticiones del motivo estimado a partir del tamaño en pares de bases del producto de PCR. La multiplicidad de infección (MOI) fue estimada tomando el locus con el máximo número de alelos (Delgado-Ratto *et al.* 2014). La diversidad genética fue medida en base a la Heterocigocidad esperada (H_e), la cual es la probabilidad de coger dos alelos distintos al azar de un conjunto de datos (Nei y Roychoudhury 1974), y está definida por la siguiente fórmula:

$$H_E = [n/(n - 1)][1 - \sum_{i=1}^L p_i^2]$$

Donde:

n: número de aislados analizados

pi: frecuencia del i-ésimo alelo.

Este indicador fue utilizado para comparar el polimorfismo de los distintos marcadores utilizados y la diversidad genética en las distintas temporadas de transmisión.

La H_e para cada marcador fue calculada utilizando el programa GenAlex v6.5 (Peakall y Smouse 2006), mientras que la H_e promedio en cada temporada fue calculada utilizando el programa R v3.3.1 (Kamvar, Tabima, y Grünwald 2014; Kamvar, Brooks and Gunwald 2015). Ambos programas proporcionaron información sobre los haplotipos presentes en la población. Además, se utilizó la prueba de

diferencias en heterocigosidad esperada (Hs.test) del software R para identificar si existían diferencias entre la diversidad genética encontrada en cada una de las temporadas.

5.7.3 Análisis de desequilibrio de ligamiento (LD)

La presencia de desequilibrio de ligamiento (asociación no aleatoria entre alelos de distintos loci), fue evaluada utilizando el programa Arlequin v3.1.1 (Excoffier, Laval, y Schneider 2007). Para ello, se calculó el Índice de asociación estandarizada (I^S_A), el cual indica la presencia de LD entre múltiples loci (Slatkin 2008). Asimismo, se analizó el desequilibrio de ligamiento utilizando solo haplotipos únicos para eliminar el efecto de la expansión epidémica de haplotipos particulares (Ferreira *et al.* 2007), dado que la presencia de haplotipos con frecuencias elevadas podría afectar la distribución de alelos y por ende el análisis.

Una de las características del panel de microsatélites evaluados fue la presencia de 2 o más de estos loci en un mismo cromosoma (por ejemplo: 2.121, 2.122 y 2.152 se encuentran en el cromosoma 2), por lo cual se decidió descartar la posibilidad de que el LD se deba únicamente a un efecto de ligamiento físico. Entonces, se rehízo el análisis utilizando solo un loci por cada cromosoma.

5.7.4 Análisis de estructuración genético-poblacional

La presencia de estructuración genética fue analizada mediante el uso de un modelo bayesiano (Pritchard año) implementado en el programa Structure v2.3 (Evanno, Regnaut, y Goudet 2005). El número más probable de *clusters* o potenciales subpoblaciones genéticas (K) fue evaluado utilizando el programa Structure

Harvester v0.6.94 (Earl y von Holdt 2012) en base al método descrito por Evanno *et al.* (2005). Tras definir los valores más probables de K, se utilizó el programa Clump v1.1.2 (Jakobsson y Rosenberg 2007) para asignar las muestras a sus respectivos *clusters* y se obtuvo una representación gráfica de estos resultados utilizando el programa Distruct v1.1. (Rosenberg 2003).

El grado de diferenciación genética entre *clusters* fue evaluado mediante un análisis discriminador de componentes principales (DAPC), utilizando el programa R. Asimismo, la diferenciación entre los haplotipos presentes en cada *cluster*, así como entre *clusters*, fue analizada mediante el gráfico de redes de distancias entre haplotipos (Minimum Spanning Network).

5.7.5 Análisis de asociación entre la estructuración genético-poblacional del parásito y las características epidemiológicas de los habitantes de la comunidad

Utilizando el programa Stata 14 (StataCorp, 2015. Stata Statistical Software: Release 14. College Station, TX), se realizó una regresión logística binomial (K=2) o multinomial (K=4, K=7), dependiendo del número de categorías de la variable dependiente, para evaluar si alguna característica clínico-epidemiológica o socio-demográfica (edad, sexo, tiempo en la comunidad, ocupación, sintomatología y patencia) presentaba asociación con alguno de los *clusters* encontrados.

Las categorías evaluadas para cada una de estas variables se describen a continuación:

- a) Edad: 0 a 5 años, 6 a 15 años, más de 15 años.
- b) Sexo: masculino, femenino.
- c) Tiempo en la comunidad: 0 a 2 años, 3 años a más.

- d) Ocupación: dentro de la comunidad, fuera de la comunidad.
- e) Sintomatología: presencia de fiebre, ausencia de fiebre. La presencia de sintomatología en una persona refiere específicamente al día en que se tomó la muestra.
- f) Patencia: patente (infección detectable por microscopía y por PCR), subpatente (infección submicroscópica solo detectable por PCR).

Aquellas características que estuvieron asociadas de manera significativa al ser evaluadas de manera individual fueron incluidas en un modelo multivariado final (tanto para la regresión binomial como para las multinomiales). De esta manera, se ajustó el efecto de cada una de las co-variables sobre la estructuración genético-poblacional.

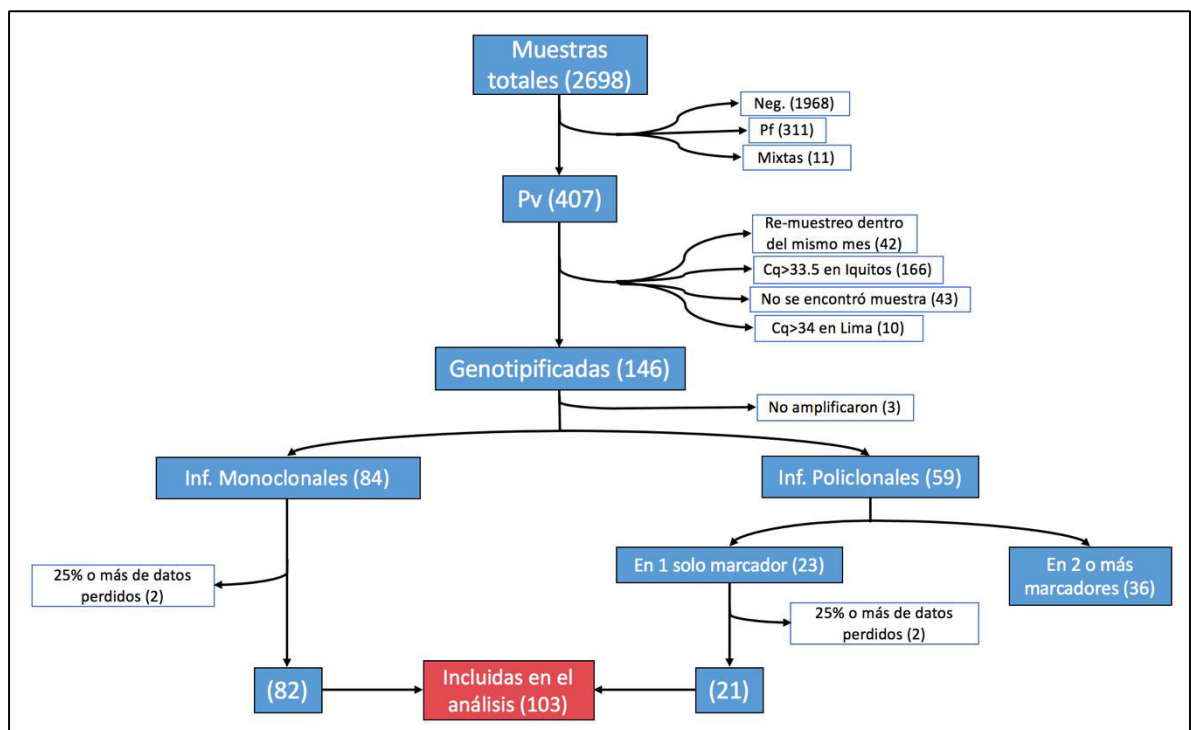


Figura 7: Flujoograma de selección de muestras y análisis

6. RESULTADOS

6.1. Características de la población de estudio

Un total de 213 personas participaron en este estudio, de las cuales el 54% fueron varones (115/213) y el 46% fueron mujeres (98/213). De ellos, el 25% (53/213) fueron niños entre 0 y 5 años, el 29% (62/213) niños entre 6 y 15 años y el 46% (98/213) fueron personas mayores a 15 años. La principal ocupación entre los miembros de la fuerza laboral de la comunidad era la agricultura (51 personas), mientras que un grupo menor de personas se dedicaba a diversas actividades como la extracción de madera, la pesca, el comercio, etc. Asimismo, un número importante de pobladores eran estudiantes (59 personas) o amas de casa (30 personas).

A partir de estos 213 individuos se obtuvo un total de 2 698 muestras (2 403 por DAC y 295 por DPC), de las cuales 408 (295 por DAC y 113 por DPC) tuvieron diagnóstico positivo para *P. vivax* a partir de la prueba de qPCR realizada en la ciudad de Iquitos. Debido al diseño del estudio, marzo 2013 fue el mes con la mayor proporción de infecciones detectadas (126/408); mientras que abril 2013 fue el mes en el cual se detectó el menor número de infecciones (11/408), al no poder realizarse la DAC (Fig. 8).

Estas 408 muestras pasaron por los múltiples filtros descritos previamente antes de realizarse la genotipificación y posterior análisis (Fig. 7). El número total de muestras que pasaron al proceso de genotipificación fue 146, de las cuales solo 3 no pudieron ser amplificadas.

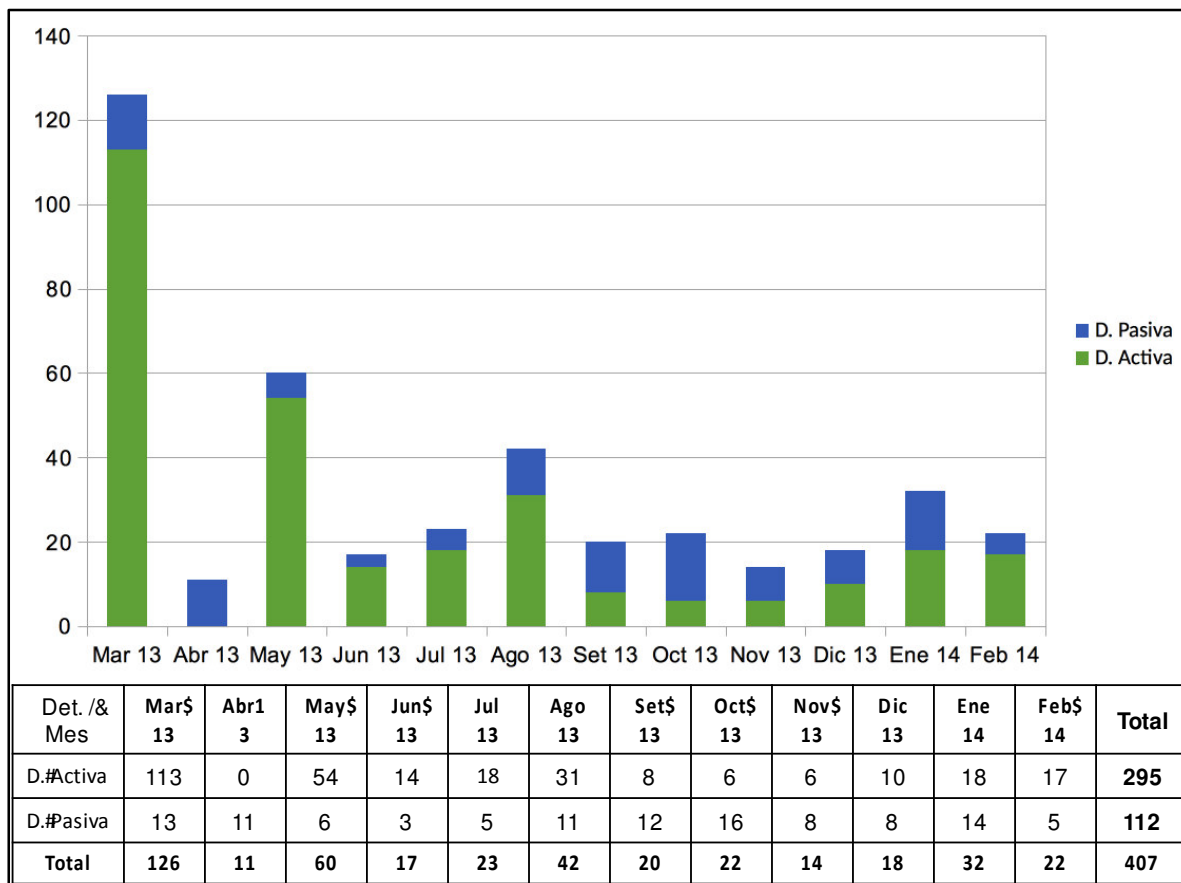


Figura 8: Número de infecciones de *P. vivax* por mes en Santa Emilia.

6.2. Genotipificación de *P. vivax*

De las 143 muestras que pudieron amplificarse exitosamente, 84 fueron monoclonales (59%) y 59 fueron policlonales (41%). De las 59 muestras policlonales, 23 (39%) lo fueron en un solo marcador, mientras que las 36 (61%) restantes lo fueron en 2 o más marcadores (Fig. 7). La multiplicidad de infección (MOI) promedio encontrada a partir de la totalidad de muestras genotipificadas fue de 1.45.

Para los análisis subsiguientes se seleccionaron solo las muestras que eran monoclonales y aquellas cuya policlonalidad se debía a un solo marcador. En ambos casos se consideraron solo aquellas cuyo porcentaje de datos perdidos (alelos

nulos) no excedía el 25%, obteniendo un total de 103 muestras incluidas (Fig. 7). Aquellas muestras provenientes de los meses de marzo, abril y mayo del año 2013 fueron consideradas como pertenecientes a la temporada llamada “Alta transmisión”, mientras que aquellas provenientes de los meses de julio, agosto, septiembre, octubre y noviembre del año 2013 correspondieron a la temporada llamada “Baja transmisión”. Dentro de la población de 103 muestras evaluadas no hubo ninguna proveniente de los meses de junio o diciembre del año 2013, mientras que hubo 4 correspondientes al año 2014 (3 de enero y 1 de febrero). Para evitar incluir en el análisis una temporada llamada “Alta transmisión 2014” (o “Alta Transmisión II”) que constara de tan solo 4 muestras se decidió incluir a estas en la temporada “Baja Transmisión” correspondiente al año 2013 (Fig. 9).

El porcentaje promedio de alelos nulos por marcador a partir de estas 103 muestras fue de 3.82%, siendo MS20 y MS6 aquellos con los valores más altos (8.74% y 7.77% respectivamente) (Fig. 10). La razón por la cual no se incluyó a aquellas muestras con porcentajes de datos perdidos mayores al 25% fue porque se pretendía estimar el porcentaje real de alelos nulos y no captar el efecto de problemas técnicos debido a bajas parasitemias. Por otra parte, la curva de acumulación de genotipos sugiere que al utilizarse 11 o más de los 16 marcadores evaluados sería posible captar el 100% de los genotipos multilocus (haplotipos) presentes en esta población (81 en total) (Fig. 11).

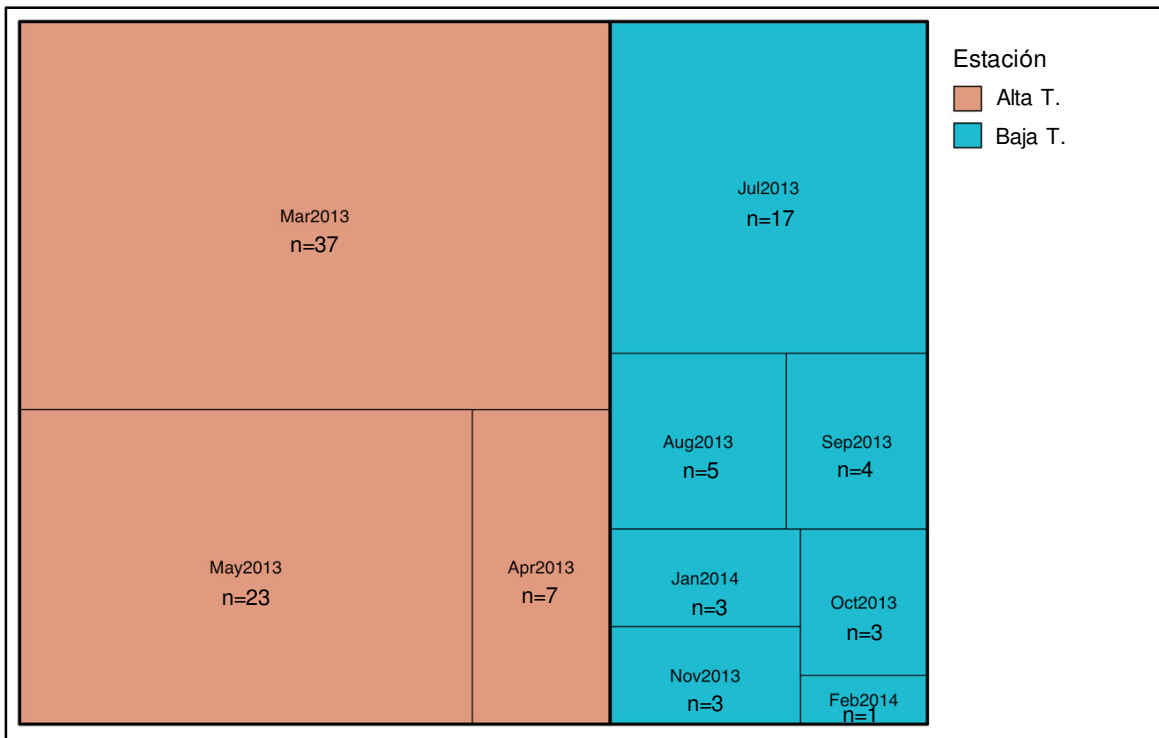


Figura 9: Estratificación de las muestras incluidas en el análisis genético-poblacional.

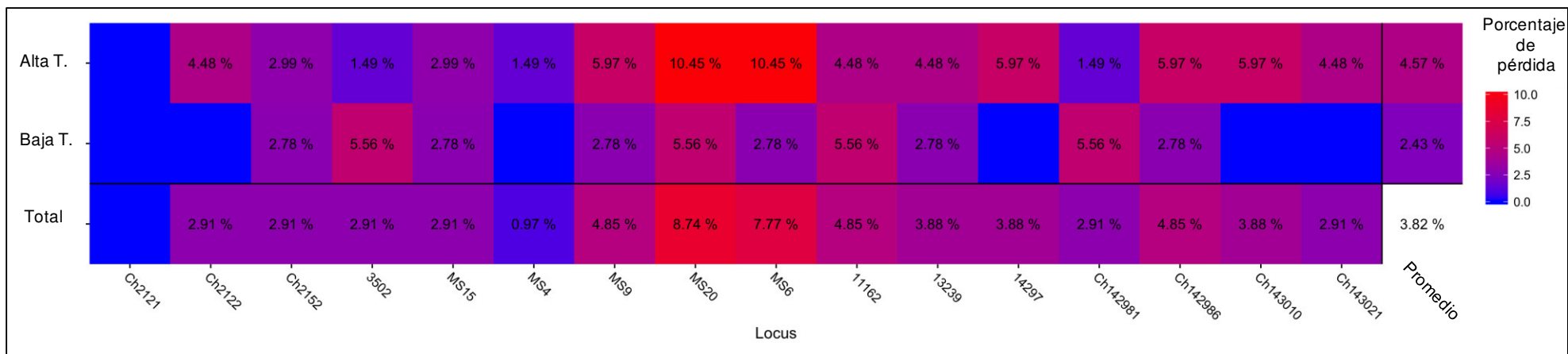


Figura 10: Porcentaje de datos perdidos por cada marcador.

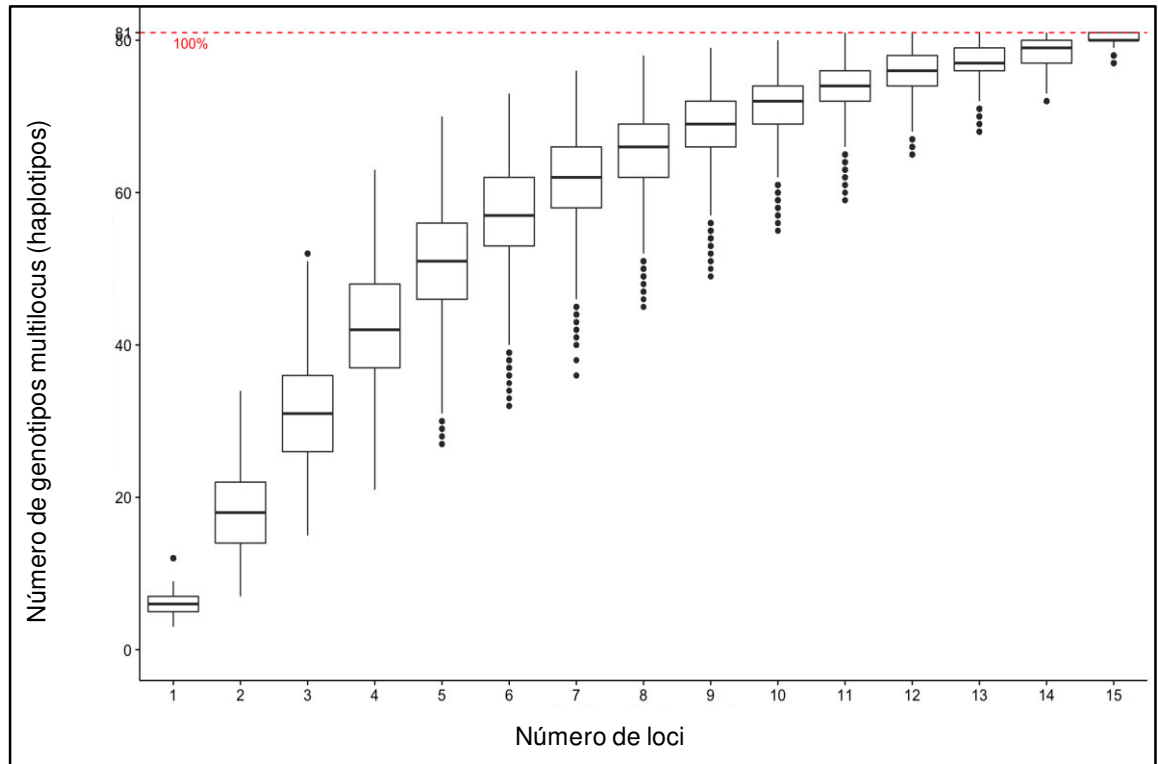


Figura 11: Curva de acumulación de genotipos.

6.3. Diversidad genética de *P. vivax*

La H_e promedio a partir del panel de marcadores utilizado fue de 0.61, con un rango de 0.33 (marcador 14.2986) a 0.80 (marcador 2.152). Si bien los valores de H_e para los marcadores 14.2986 ($H_e=0.33$) y 3.502 ($H_e=0.39$) fueron particularmente bajos, el resto de marcadores tuvieron valores de H_e mayores o iguales a 0.47, lo cual mantuvo la mediana en un valor de 0.625 (Tabla 2). El número promedio de alelos por locus fue de 5.62, siendo 2.152 (11 alelos) y 13.239 (2 alelos) aquellos con mayor y menor número respectivamente. El número total de haplotipos obtenido fue 81, de los cuales 62 estuvieron presentes en la temporada de “Alta Transmisión” y solo 24 en la temporada de “Baja Transmisión” (Tabla 3).

Locus	N° Alelos	He	Uniformidad
Ch2.121	7	0.73	0.76
Ch2.122	4	0.52	0.71
Ch2.152	11	0.80	0.73
3.502	4	0.39	0.58
MS15	8	0.79	0.84
MS4	5	0.48	0.53
MS9	7	0.72	0.81
MS20	8	0.78	0.84
MS6	5	0.67	0.72
11.162	6	0.62	0.71
13.239	2	0.47	0.93
14.297	6	0.63	0.68
Ch14.2981	4	0.62	0.86
Ch14.2986	2	0.33	0.73
Ch14.3010	6	0.68	0.72
Ch14.3021	5	0.47	0.74
Promedio	5.63	0.61	0.74
Mediana	5.5	0.63	0.73
Marcadores Karunaweera		He promedio = 0.69	
Marcadores Imwong		He promedio = 0.53	
Marcadores Nuevos		He promedio = 0.59	

Tabla 2: Diversidad genética (He) por cada locus evaluado.

Al calcular la He promedio utilizando únicamente los marcadores propuestos por Karunaweera (MS4, MS6, MS9, MS15, MS20) se obtuvo un valor de 0.69, mientras que los valores para el grupo de marcadores de Imwong (3.502, 11.162, 13.239 y 14.297) y el panel de nuevos marcadores (Ch2.121, Ch2.122, Ch2.152, Ch14.2981, Ch14.2986, Ch14.3010 y Ch14.3021) fueron 0.53 y 0.59 respectivamente. Tomando como referencia los marcadores de Karunaweera, los cuales eran los únicos que habían sido evaluados anteriormente en la Amazonía Peruana (Van den Eede, Van der Auwera, *et al.* 2010; Van den Eede *et al.* 2011; Delgado-Ratto *et al.* 2014, Delgado-Ratto *et al.* 2016), y tomando en cuenta el aislamiento geográfico de la comunidad de Santa Emilia, se puede considerar que la diversidad genética encontrada es elevada.

El programa R determinó que no existían diferencias significativas ($p=0.51$) al comparar la diversidad genética encontrada en la temporada de alta transmisión con

aquella encontrada en la temporada de baja transmisión. En efecto, los valores de He promedio para “Alta Transmisión” y “Baja Transmisión” fueron 0.62 y 0.59 respectivamente, reafirmando así la alta similitud entre ellas (Tabla 3). Al intentar realizar un análisis más detallado, el número limitado de muestras por mes impidió evaluar si existían diferencias significativas al comparar una a una la diversidad genética encontrada en cada uno de ellos.

Población	Temporada	N	Haplotipos	He
103	Alta transmisión	67	54	0.62
	Baja transmisión	36	32	0.59
	Total	103	81	0.61
85	Alta transmisión	61	51	0.61
	Baja transmisión	24	23	0.59
	Total	85	71	0.60

Tabla 3: Diversidad genética (He) por temporada en la población total analizada (103) y considerando solo una muestra por persona (85).

Es importante mencionar que en el presente estudio se analizó la diversidad genética considerando todas las muestras como individuales, es decir, si una persona aportó más de una muestra al total de muestras analizadas, todas fueron consideradas como provenientes de individuos distintos. Un problema potencial de esta estrategia de análisis ocurre cuando los diferentes episodios de malaria vivax de una persona son causados por parásitos con el mismo haplotipo, pues esto puede conllevar a la sobrerrepresentación de este. Sin embargo, en este estudio solo hubo un caso en el cual los 3 episodios maláricos correspondientes a una persona fueron causados por parásitos con el mismo haplotipo. En todos los demás casos, los 2 ó 3 episodios correspondientes a una misma persona fueron causados por parásitos con haplotipos distintos.

Para descartar una posible desviación de la realidad debido a la estrategia de análisis, se decidió evaluar la diversidad genética considerando solo 1 muestra por persona a lo largo de todo el periodo de estudio, incluyendo así solo 85 muestras en este nuevo análisis. Los valores de diversidad genética obtenidos fueron muy similares a los encontrados con la población de 103 muestras, tanto para las muestras totales ($He=0.60$) como al dividir las en temporadas de Alta ($He=0.61$) y Baja ($He=0.59$) Transmisión (Tabla 3). Además, la prueba "Hs.test" del programa R determinó que no existían diferencias significativas ($p=0.96$) entre la diversidad genética encontrada con la población de 103 muestras y aquella encontrada con la población de 85 muestras.

6.4. Desequilibrio de ligamiento

Además de encontrarse una alta diversidad genética, también se encontró un alto nivel de desequilibrio de ligamiento ($I^S_A=0.19$, $p<0.001$) en la población parasitaria presente en la comunidad de Santa Emilia. Al rehacer el análisis utilizando solo 1 muestra por haplotipo (81 muestras), el LD se mantuvo significativo ($I^S_A=0.16$, $p<0.001$) (Tabla 4).

Por otra parte, cuando se hizo la exclusión de marcadores para eliminar el efecto del ligamiento físico sobre el análisis, los niveles de LD se mantuvieron significativos tanto en la población total de 103 muestras ($I^S_A=0.17$, $p<0.001$) como en aquella que solo incluía haplotipos únicos ($I^S_A=0.14$, $p<0.001$) (Tabla 4).

Población	I^S_A	p
103	0.19	<0.001*
103 / Haplotipos únicos (81)	0.16	<0.001*
103 / Exclusión de marcadores	0.17	<0.001*
103 / Haplotipos únicos (81) / Exclusión de marcadores	0.14	<0.001*

Tabla 4: Índices de desequilibrio de ligamiento (I^S_A) para la población total analizada (103) y considerando solo una muestra por haplotipo (81). Ambas poblaciones fueron reanalizadas evaluando solo un loci por cromosoma.

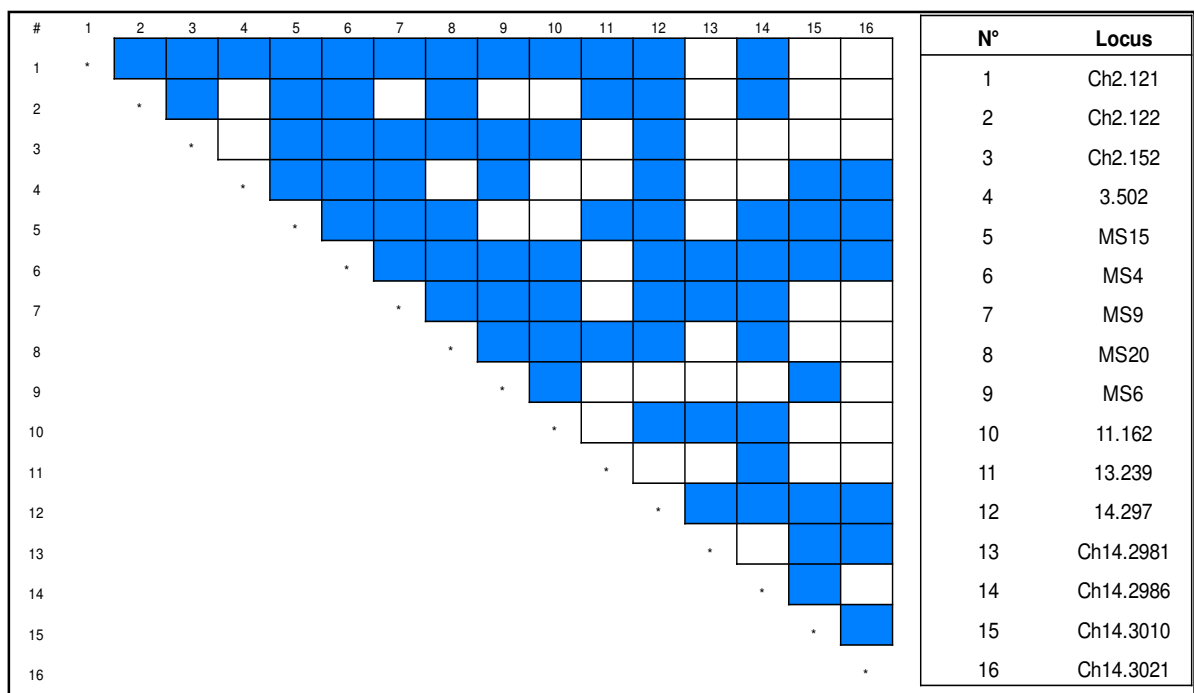


Figura 12: Desequilibrio de ligamiento pareado entre los loci evaluados.

El análisis pareado de desequilibrio de ligamiento entre los loci utilizados (Fig. 12) reafirmó la ausencia de un efecto trascendente de ligamiento físico al identificar asociaciones significativas entre varios de ellos y no solo entre aquellos localizados en un mismo cromosoma (Ch2.121-Ch2.122-Ch2.152, MS6-11.162 y 14.297-

Ch14.2981-Ch14.2986-Ch14.3010-Ch14.3021). Estos resultados sugieren que otros fenómenos como la endogamia o la importación de clonas tomarían un rol determinante en la comunidad de Santa Emilia, causando los niveles de desequilibrio de ligamiento observados.

6.5. Estructuración genético-poblacional

El programa Structure detectó la presencia de estructuración genética en la población de parásitos *P. vivax* presente en la comunidad de Santa Emilia. Al calcular el número más probable de *clusters* (potenciales subpoblaciones genéticas) presentes en la población, utilizando el programa Structure Harvester, se obtuvo un gráfico con 4 picos correspondientes a los valores de $K=2$ ($\Delta K=6.94$), $K=4$ ($\Delta K=7.93$), $K=7$ ($\Delta K=19.66$) y $K=10$ ($\Delta K=7.55$) (Fig. 13).

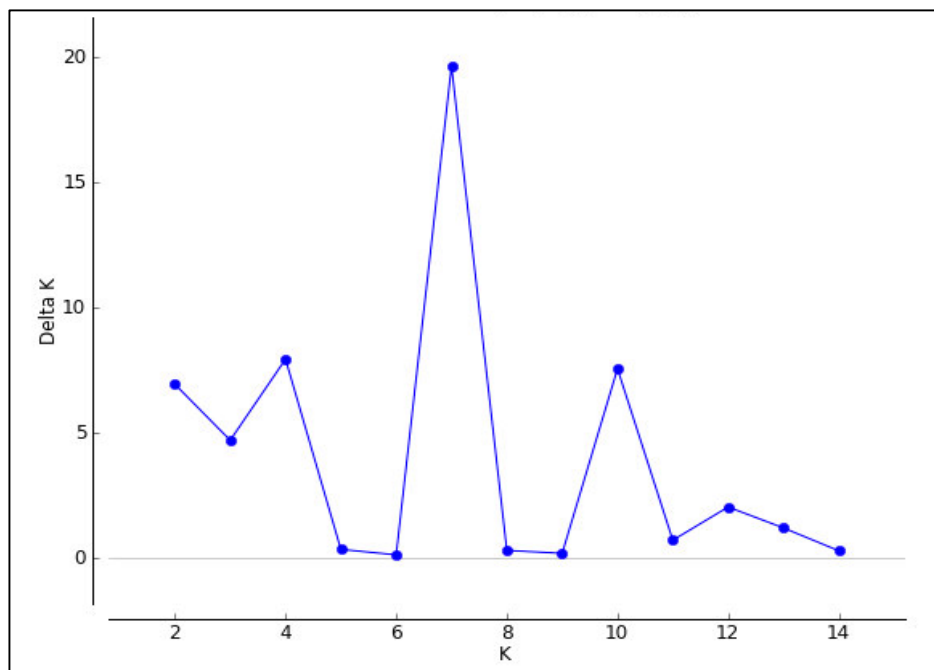


Figura 13: Evaluación del número más probable de clusters presente en la población.

Sin embargo, siendo 60 el número máximo de infecciones detectadas a partir de un muestreo único dentro de un mes (Fig. 8), en una población que apenas sobrepasaba las 200 personas, la presencia de 7 subpoblaciones genéticas de *P. vivax* fue evaluada con mucho cuidado. De manera alternativa se propuso que, si bien el número más probable de *clusters* determinado por el programa Structure fue 7, también era posible la existencia de solo 2 o 4 subpoblaciones genéticas, a partir de las cuales se produjeron expansiones clonales de ciertos haplotipos, conduciendo al programa a la generación de un nivel mayor de estructuración que incluía 7 *clusters*.

En base a esta premisa, se decidió realizar los análisis posteriores considerando tres valores probables para K: 2, 4 y 7. Se optó por esta estrategia debido a que, si se confirmaba o no la hipótesis de las expansiones clonales, el máximo número de subpoblaciones que podría validarse sería 7, por lo cual el análisis para K=10 resultaba ser innecesario. Al analizar la dinámica de la estructuración de *P. vivax* en Santa Emilia a partir de los gráficos generados por el programa Distruct (Fig. 14), se pudo observar que en la transición de K=2 a K=4 solo uno de los *clusters* iniciales se subdivide en 3, obteniendo un total de 4; mientras que en la transición de K=4 a K=7, es el *cluster* que se había mantenido intacto anteriormente el que esta vez se subdivide en 3. Adicionalmente, cuando K=7, se forma un *cluster* híbrido con individuos provenientes de los distintos *clusters* presentes cuando K=4, obteniendo así un total de 7 (Fig. 15).

Las redes de haplotipos (*Minimum Spanning Network*) para cada uno de los distintos K evaluados permiten apreciar con mayor facilidad la subdivisión de 2 *clusters* iniciales que progresivamente se convierten en 7 (Figs. 16-18). Además, resalta la presencia de un número considerable de haplotipos con alta similitud.

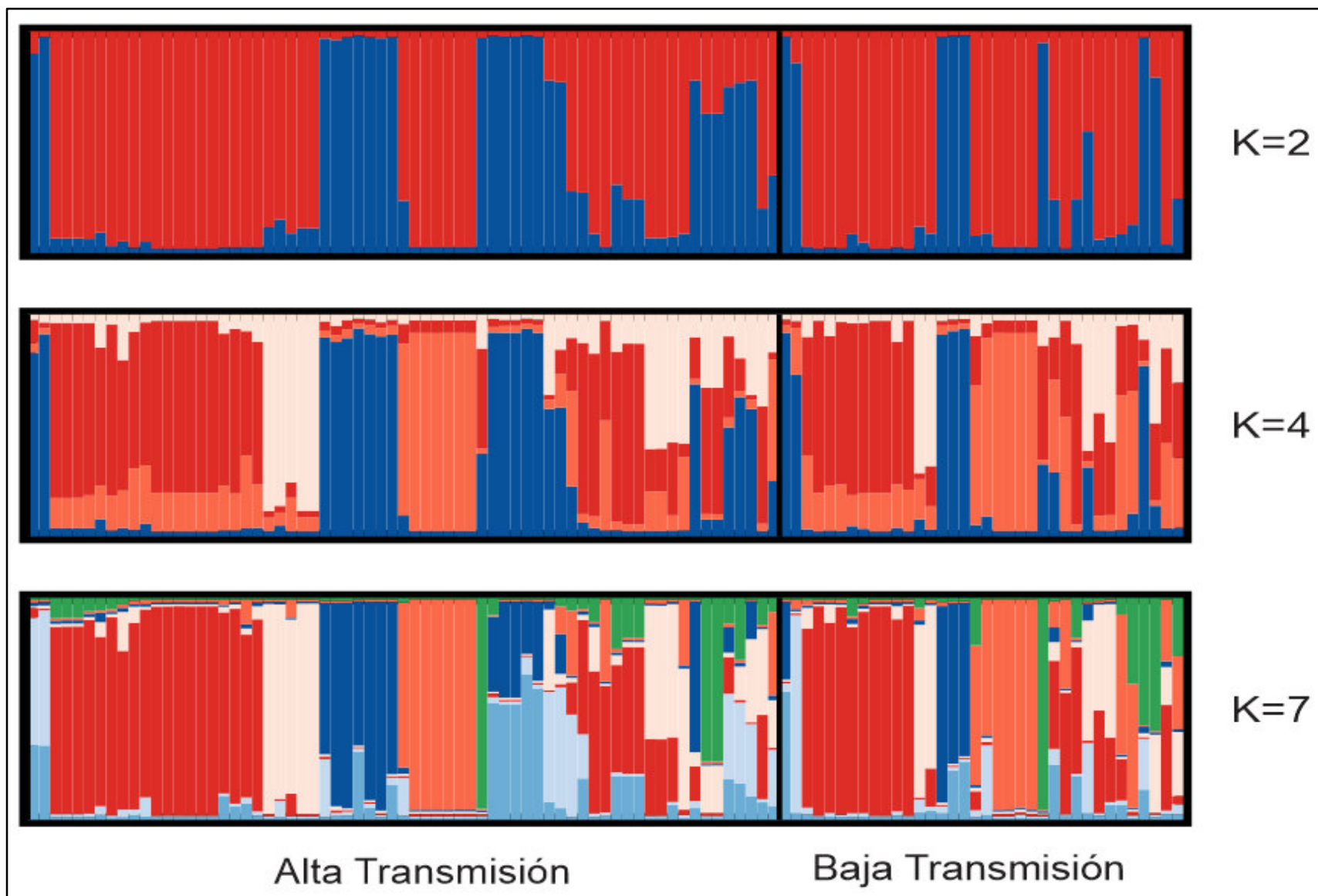


Figura 14: Estructuración genético-poblacional de *P. vivax* en Santa Emilia.

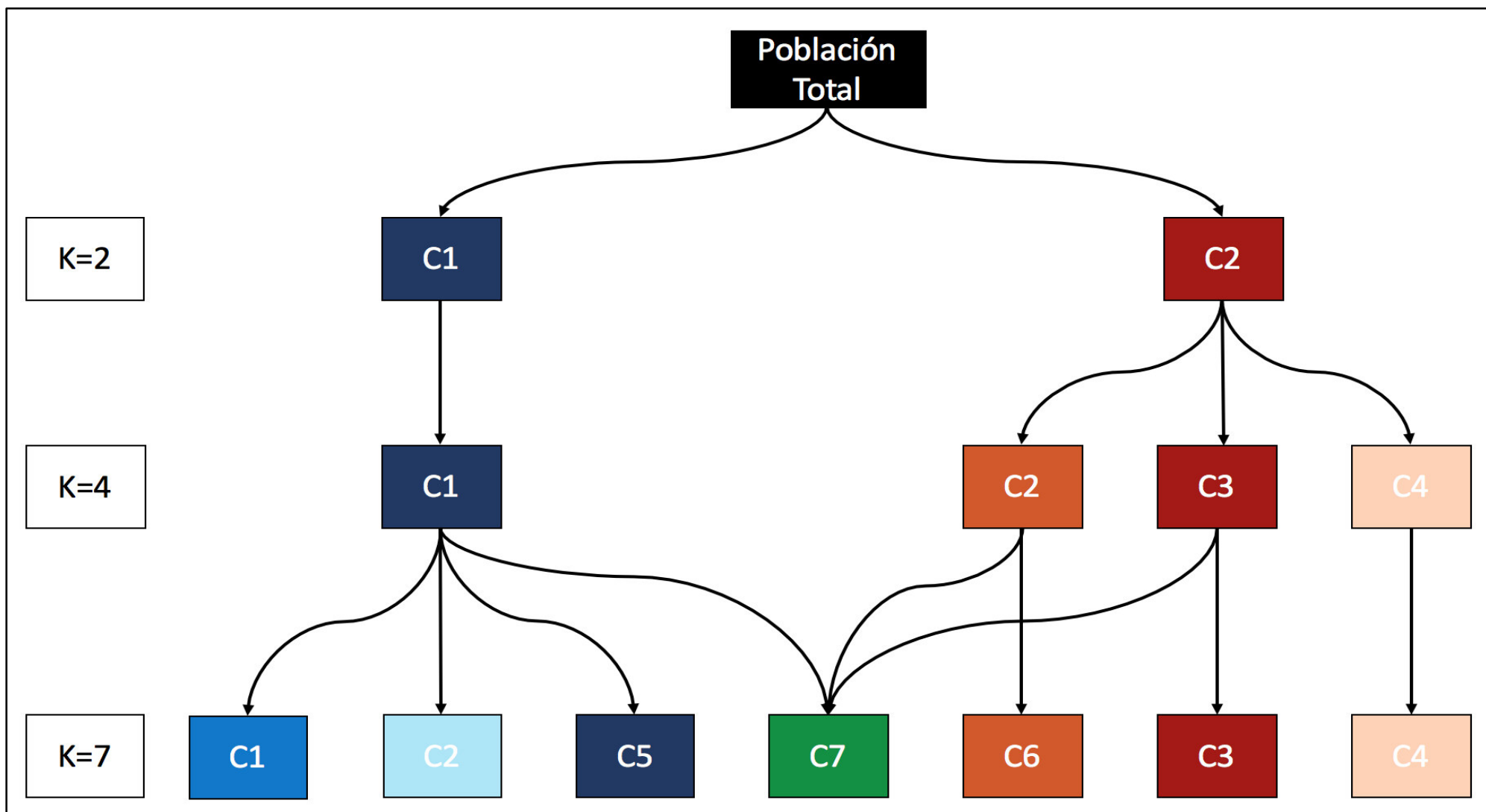


Figura 15: Esquema de la subdivisión de clusters en la población de *P. vivax* de Santa Emilia.

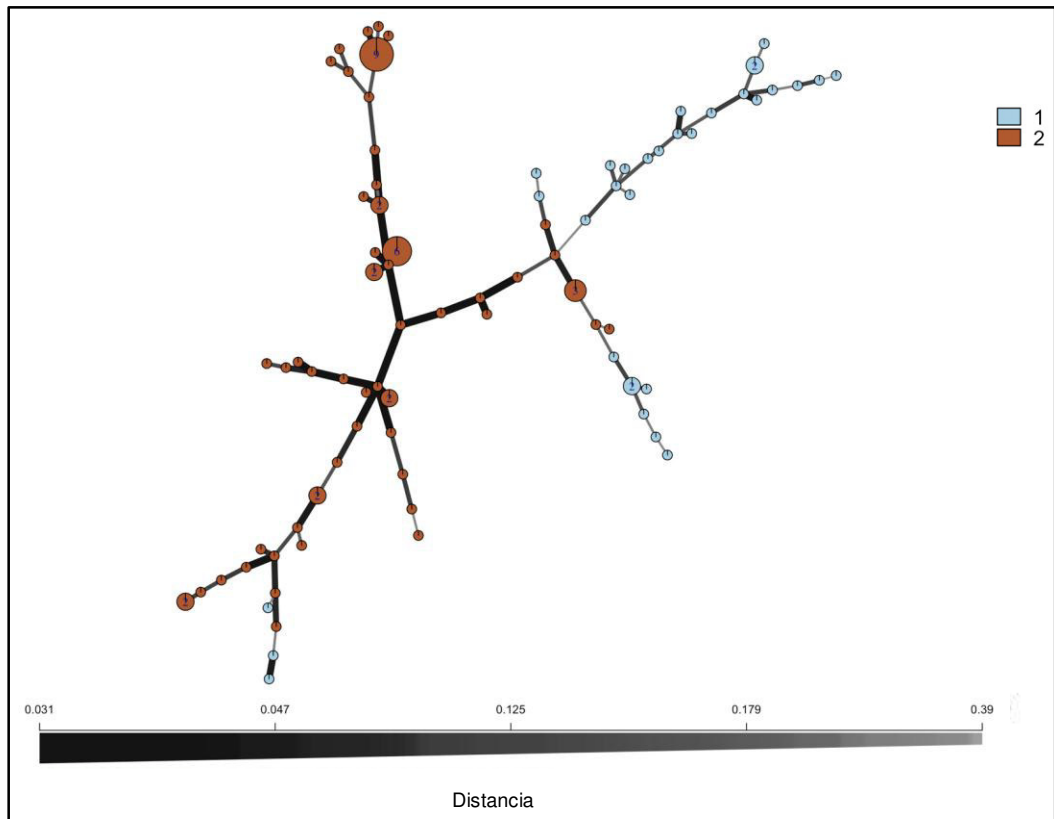


Figura 16: Red de haplotipos (Minimum Spanning Network) para K=2.

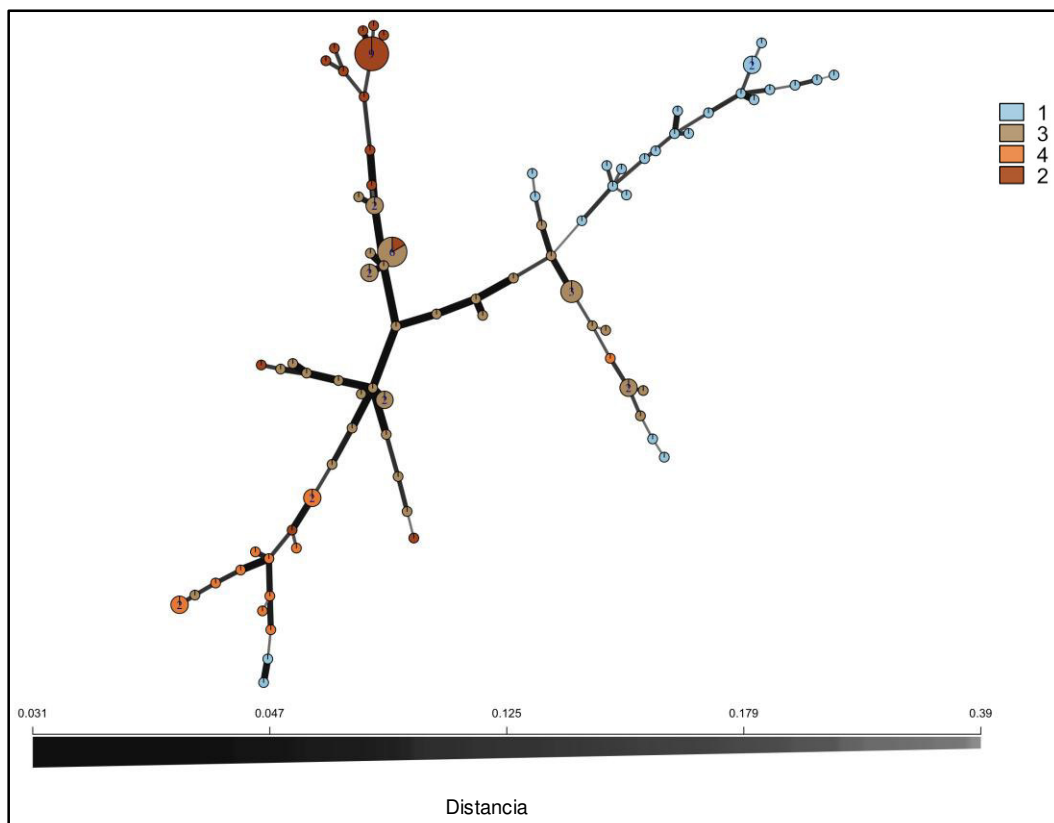


Figura 17: Red de haplotipos (Minimum Spanning Network) para K=4.

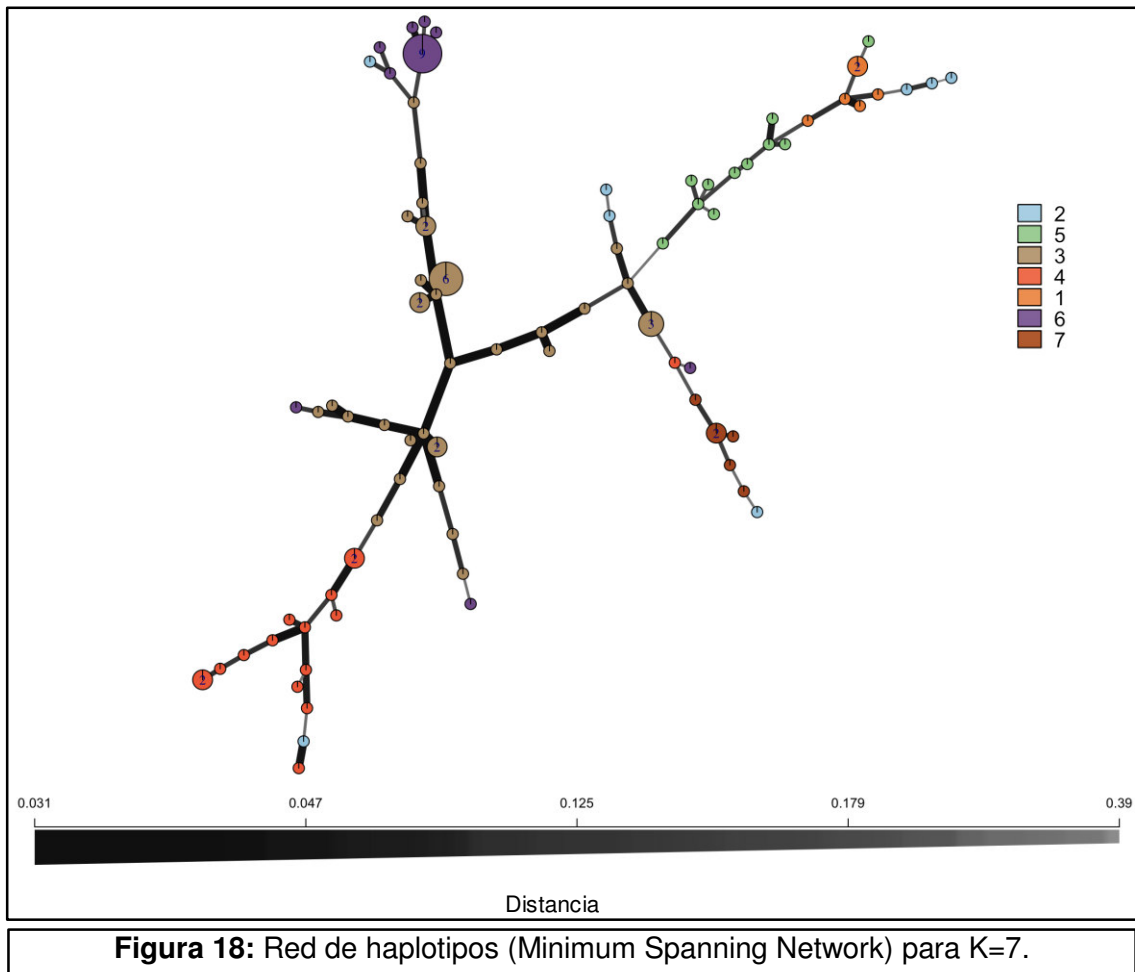


Figura 18: Red de haplotipos (Minimum Spanning Network) para K=7.

El análisis DAPC reveló las principales relaciones de diferenciación genética entre los *clusters* formados para cada uno de los valores probables de K (2, 4 y 7). Cuando se asume que K=2, se encuentra una sola función discriminadora que permite capturar el 38% de la varianza entre *clusters*. Al analizar gráficamente dicha varianza (Fig. 19) se puede observar una región de superposición, lo cual indica que cuando hay tan solo 2 *clusters* no existe una diferenciación completamente clara entre las muestras.

Cuando se asume que K=4, se encuentran 3 funciones discriminadoras que llegan a capturar el 57% de la varianza. Al graficar la diferenciación entre *clusters* a partir

de las 2 funciones discriminatorias con mayor contribución (Fig. 20) se puede visualizar con mayor claridad la separación entre ellos, en contraste con lo observado cuando $K=2$. El mayor grado de diferenciación cuando $K=4$ se da entre el *cluster* 1 y los *clusters* restantes (2, 3 y 4).

Cuando se asume que $K=7$, se encuentran 5 funciones discriminatorias que logran capturar el 71% de la varianza entre *clusters*. Al analizar la diferenciación en base a las 2 funciones discriminatorias más importantes (Fig. 21) se observa que los *clusters* 1 y 5 presentan diferencias mínimas, los cuales a su vez presentan el menor grado de diferenciación con el *cluster* 2, siendo estos 3 los *clusters* provenientes de la subdivisión del *cluster* 1 en la transición de $K=4$ a $K=7$. Los *clusters* 3, 4 y 6, presentes en $K=7$, corresponden a los *clusters* 3, 4 y 2 respectivamente, presentes cuando $K=4$. Asimismo, el *cluster* 7, establecido como el *cluster* híbrido, presenta menores diferencias con los *clusters* 2 y 6 que con el resto de los *clusters* (Fig. 22).

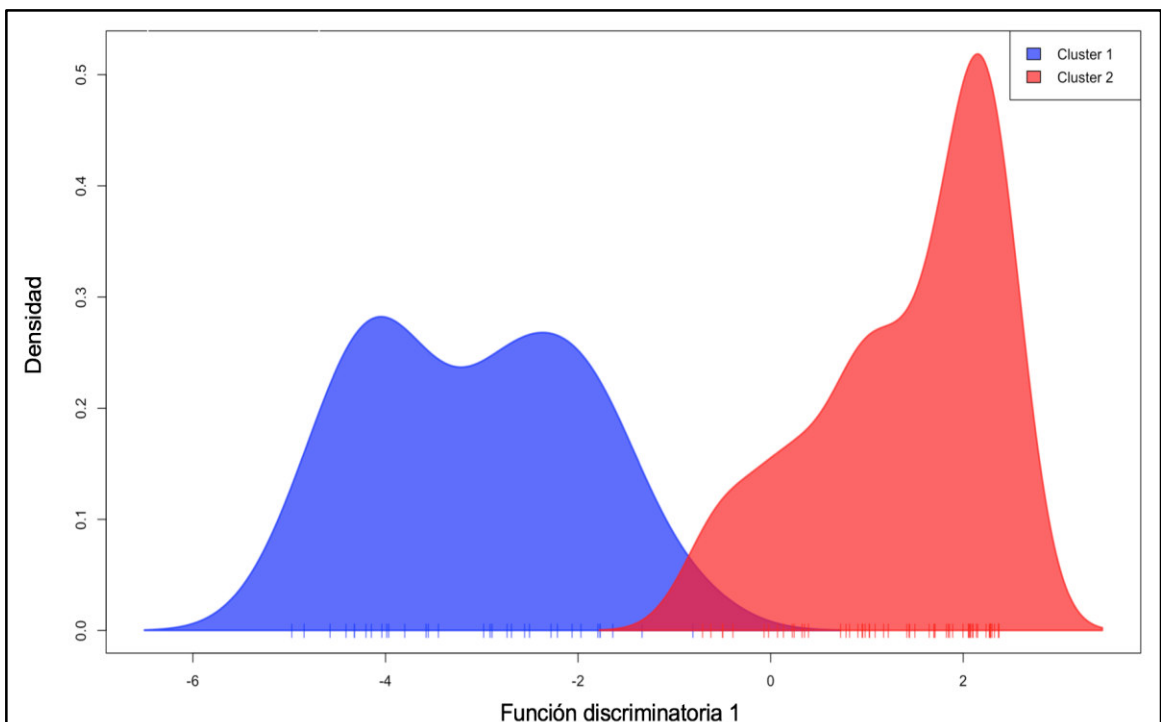


Figura 19: Análisis discriminatorio de componentes principales (DAPC) para $K=2$.

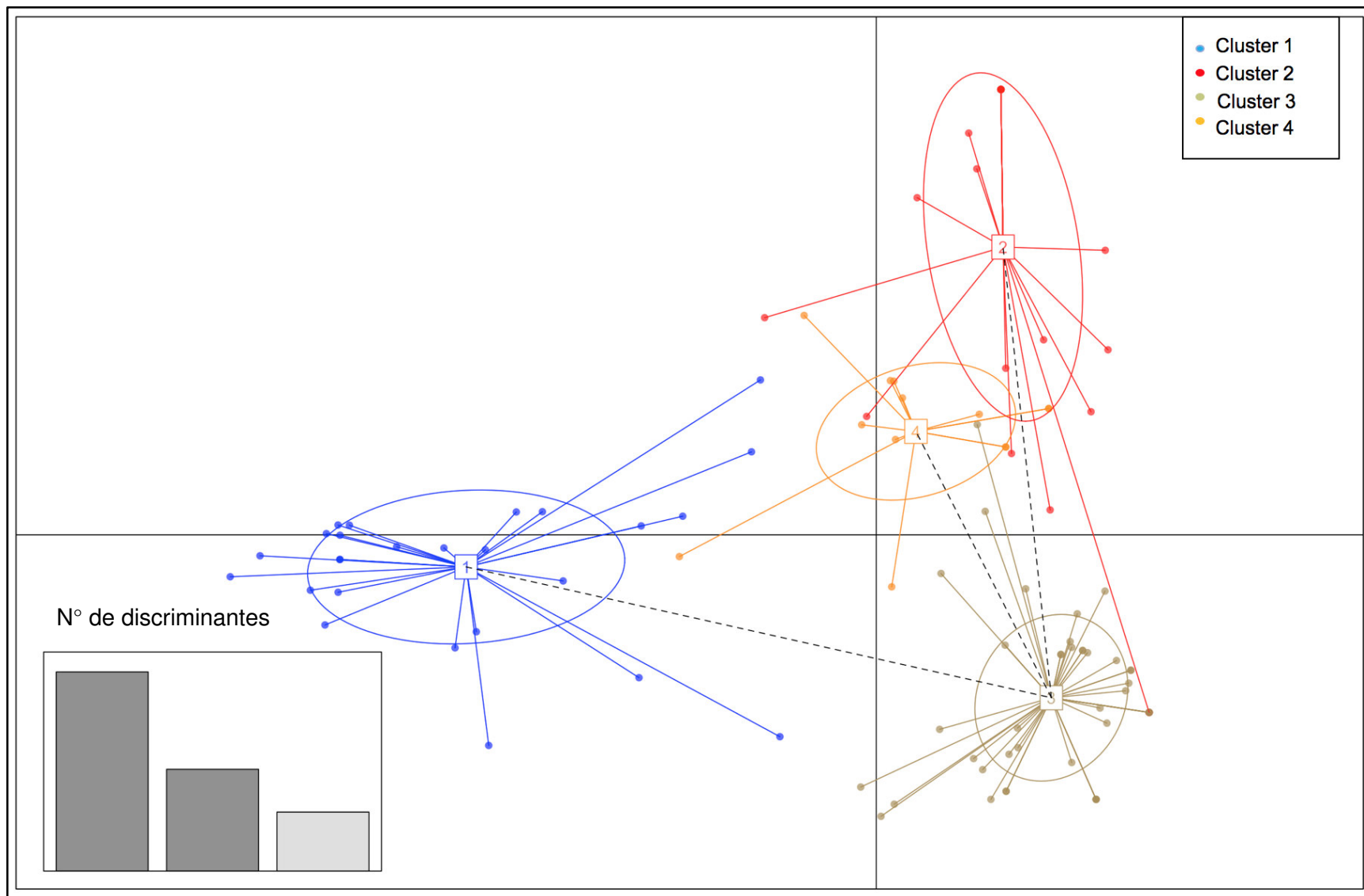


Figura 20: Análisis discriminatorio de componentes principales (DAPC) para K=4.

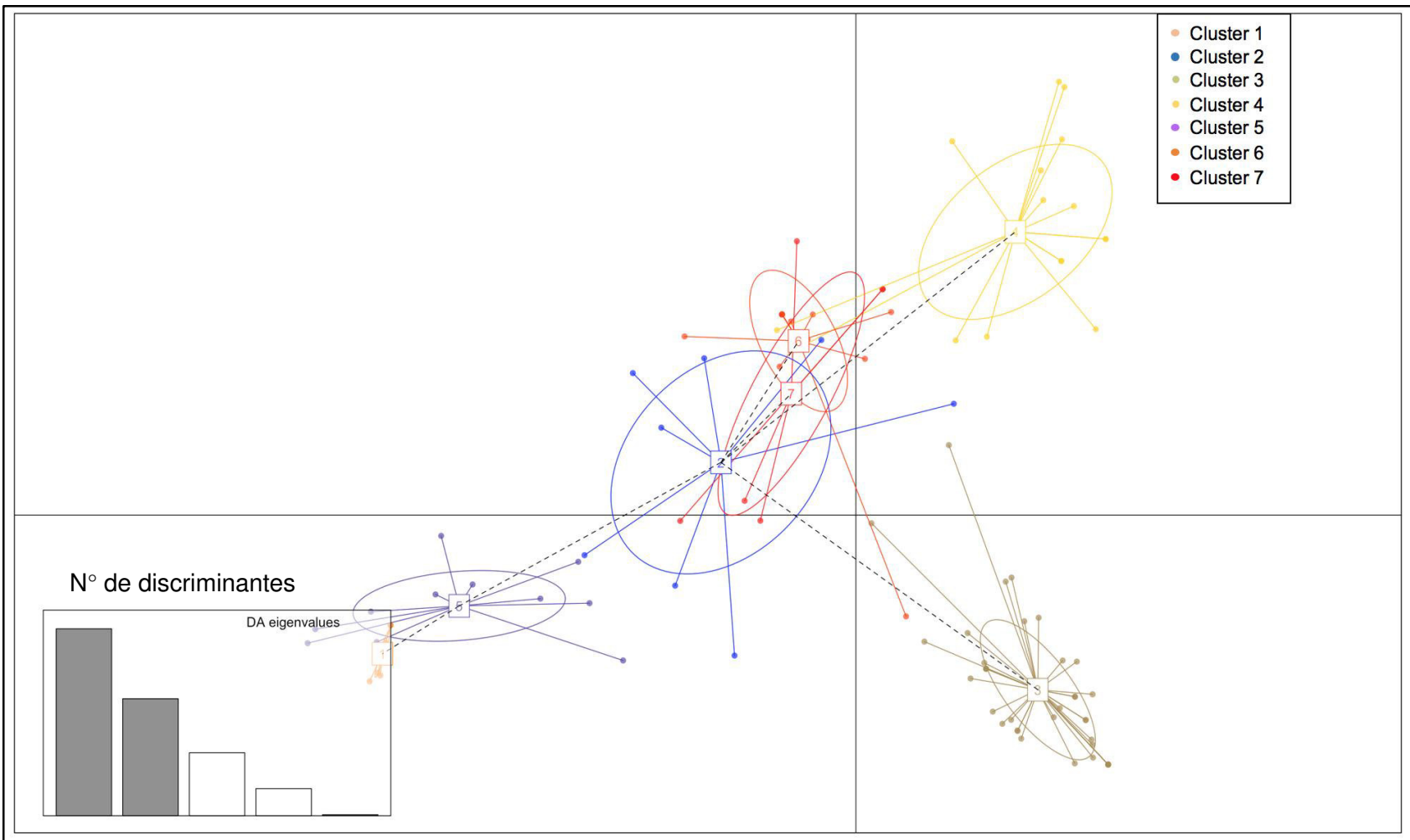


Figura 21: Análisis discriminatorio de componentes principales (DAPC) para K=7.

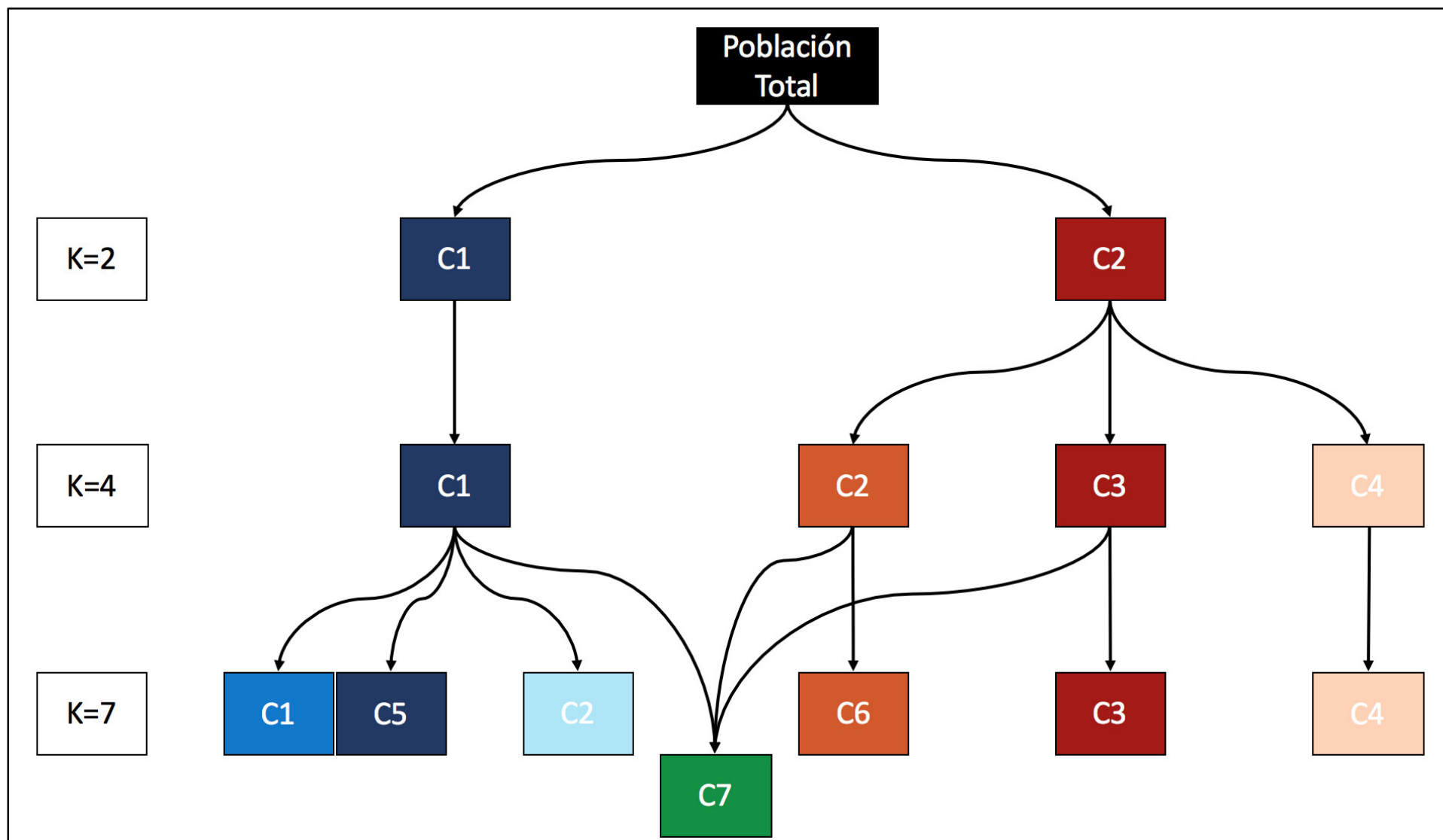


Figura 22: Esquema de la relación entre los clusters formados para cada valor de K.

6.6. Asociación entre la estructuración genético-poblacional de *P. vivax* y las características epidemiológicas de los habitantes de la comunidad

De las 103 muestras incluidas en los análisis de diversidad y estructuración genética, solo 96 presentaron datos epidemiológicos completos para realizar el análisis de asociación. De estas 96 muestras, 50 (52%) correspondieron a varones, mientras que 46 (48%) correspondieron a mujeres. De ellas, el 39% (38/96) correspondió a niños entre 0 y 5 años, el 42% (40/96) a niños entre 6 y 15 años y el 19% (18/96) a personas mayores a 15 años.

Solo el 27% de las muestras (26/96) correspondieron a personas con 2 años o menos como habitantes de Santa Emilia, mientras que el 73% (70/96) correspondieron a personas con 3 o más años en la comunidad. El 57% (55/96) de muestras fue proporcionado por personas cuya ocupación principal se desarrollaba dentro de la comunidad (estudiantes y amas de casa principalmente), mientras que el 43% (41/96) fue proporcionado por personas que salían de la comunidad para realizar sus labores (agricultores, madereros, pescadores, comerciantes, etc.).

La mayor proporción de muestras correspondió a infecciones asintomáticas y subpatentes. Específicamente, solo el 26% (25/96) de ellas estuvo acompañada con episodios febriles el día de la toma de muestra, mientras que el 74% (71/96) no presentó dicho síntoma. Asimismo, solo el 28% (27/96) de dichas infecciones fueron detectables por microscopía y PCR, mientras que el otro 72% (69/96) solo pudo ser detectado por el diagnóstico molecular.

El modelo final fue evaluado solo para $K=2$ y $K=4$ debido a que al subdividir la población en 7 ($K=7$) el número de muestras en cada *cluster* era muy pequeño y por ende no había suficiente poder estadístico. El análisis asumiendo $K=2$ reveló que no

había asociación significativa de ninguna de las variables con la estructuración genético-poblacional, reafirmando la falta de una diferenciación ostensible entre los *clusters* formados.

En el modelo final de la regresión logística multinomial para K=4 solo se incluyó al sexo, el tiempo en la comunidad y la ocupación como co-variables. La edad no fue incluida debido a que generaba mucha subdivisión en la población, lo cual reducía el poder estadístico del análisis; mientras que la sintomatología (fiebre) y el estado de patencia no llevaron a evidenciar diferencia alguna entre los grupos poblacionales del parásito debido a la notable predominancia de casos asintomáticos y subpatentes en cada uno de ellos, por lo cual estas 2 variables también fueron descartadas.

En este análisis se encontró asociación significativa de las variables sexo y ocupación con *clusters* particulares (Tabla 5). Específicamente, al tomar el *cluster* 1 como base, se encontró que los varones tenían 3.68 veces (IC 95% = 1.04 – 12.98; $p=0.043$) la probabilidad de las mujeres, de ser infectados por parásitos del *cluster* 2; mientras que las personas cuya ocupación se lleva a cabo dentro de la comunidad tenían 8.21 (IC 95% = 1.07 – 63.36; $p=0.043$) veces la probabilidad de los que laboraban fuera de ella, de ser infectados por parásitos pertenecientes al *cluster* 4.

K4	Características	RRR	Int. Confianza 95%		p
Cluster 1	(Base)				
Cluster 2	Sexo (M / F)	3.68	1.04	12.98	0.043*
	Tiempo en la comunidad (≤ 2 / ≥ 3)	3.62	0.72	18.3	0.120
	Ocupación (Dentro / Fuera)	1.80	0.44	7.34	0.411
Cluster 3	Sexo (M / F)	1.64	0.57	4.73	0.360
	Tiempo en la comunidad (≤ 2 / ≥ 3)	1.80	0.44	7.37	0.412
	Ocupación (Dentro / Fuera)	1.11	0.35	3.57	0.860
Cluster 4	Sexo (M / F)	3.70	0.81	16.79	0.091
	Tiempo en la comunidad (≤ 2 / ≥ 3)	5.24	0.68	40.19	0.111
	Ocupación (Dentro / Fuera)	8.21	1.07	63.36	0.043*

Tabla 5: Asociación de la estructuración genética con los datos epidemiológicos.

7. DISCUSIÓN

En el presente estudio se realizó un análisis exhaustivo de la genética poblacional de *P. vivax* en Santa Emilia, una comunidad localizada en la Amazonía Peruana a la cual solo es posible acceder por vía fluvial (144 km) después de recorrer previamente la totalidad de la carretera Iquitos-Nauta (98 km). Tras la ausencia prolongada de programas de control de malaria en la comunidad, debido principalmente a su aislamiento geográfico, resulta sumamente valioso generar conocimiento acerca de la diversidad genética y estructuración genético-poblacional del parásito, para entender su diversificación, identificar características de la transmisión local y reconocer factores asociados con la presencia de subpoblaciones genéticas específicas.

7.1. Multiplicidad de infección

La MOI promedio encontrada en Santa Emilia fue 1.45, sin embargo, existen distintos escenarios a partir de los cuales podría explicarse este valor. Por ejemplo, la presencia de un pequeño porcentaje de infecciones policlonales con una elevada MOI podría generar el mismo resultado que la contribución equitativa entre infecciones monoclonales e infecciones policlonales con un valor moderado de MOI (Van den Eede, Van der Auwera, et al. 2010; Delgado-Ratto et al. 2016). En el caso de Santa Emilia, la presencia de una proporción significativa de infecciones policlonales (41%), con una MOI media de 2.1, reveló que el número promedio de parásitos distintos (distinto haplotipo) presentes en una persona infectada de esta comunidad varía entre 1 a 2.

7.2. Diversidad genética

Analizar la diversidad genética de *P. vivax* de manera aislada no tendría ningún valor para aquellos responsables de la implementación de políticas y estrategias para el control de la malaria en la Amazonía Peruana, por lo cual es importante contrastar los resultados de este estudio con aquellos obtenidos en distintos contextos de transmisión.

La heterocigosidad promedio en este estudio fue calculada a partir de 3 paneles de marcadores distintos. No obstante, solo aquellos propuestos por Karunaweera habían sido evaluados previamente en la Amazonía Peruana (Van den Eede, Van der Auwera, *et al.* 2010; Van den Eede *et al.* 2011; Delgado-Ratto *et al.* 2014, Delgado-Ratto *et al.* 2016). Los niveles de diversidad genética encontrados en Santa Emilia a partir de estos marcadores fueron menores a aquellos reportados en la localidad de Moronacocha (Van den Eede, Van der Auwera, *et al.* 2010), conformada por un conjunto de comunidades urbanas y periurbanas ubicadas en la parte norte de Iquitos, y levemente menores en comparación a aquellos encontrados en la jurisdicción de Mazán (Van den Eede, Van der Auwera, *et al.* 2010), ubicada 20 km al noreste de la ciudad (de Iquitos) y accesible mediante un viaje de solamente 45 minutos en bote. Las diferencias encontradas fueron similares cuando se realizó la comparación considerando el panel completo de marcadores utilizados en cada estudio (Tabla 6).

Sin embargo, la diversidad genética de *P. vivax* encontrada en Santa Emilia fue mayor a la hallada en Manacamiri, Lupuna, Fray Martín, San Pedro y Santa Rita (Van den Eede, Van der Auwera, *et al.* 2010; Van den Eede *et al.* 2011), un conjunto de comunidades ubicadas a pocos kilómetros (3-7 km) al noreste de Iquitos, a las cuales es posible acceder a través del río Nanay. Al ser comunidades vecinas, los

estudios acerca de la genética poblacional de *P. vivax* suelen considerarlas dentro de una misma área o zona de estudio y calcular la heterocigosidad promedio a partir de las 5. Las diferencias encontradas fueron menores cuando se realizó la comparación considerando los paneles completos de marcadores, siendo la heterocigosidad de Santa Emilia ligeramente mayor que la de las 5 comunidades.

Al comparar los valores de diversidad genética de Santa Emilia con los encontrados en San Carlos, una comunidad aislada en el bosque, ubicada a 10 km de la carretera Iquitos-Nauta (Van den Eede, Van der Auwera, *et al.* 2010; Delgado-Ratto *et al.* 2014), se halló que los primeros fueron mayores. Las diferencias se incrementaron al considerar paneles completos de marcadores, siendo la diversidad genética de Santa Emilia notablemente mayor a la encontrada en San Carlos. Si bien San Carlos es una comunidad que también presenta aislamiento geográfico, es preciso resaltar que el acceso a Santa Emilia es incluso más difícil, situación que limitaría significativamente el flujo génico entre esta última y otras localidades de la Amazonía. Sin embargo, en oposición al grado de aislamiento, San Carlos presentó menores valores de diversidad genética.

La ausencia de programas de control de malaria en Santa Emilia hasta el año 2013 cumplió un rol importante en el mantenimiento de la población parasitaria en la comunidad y nos proporciona una explicación plausible para los niveles de heterocigosidad encontrados. Las poblaciones de *P. vivax* tienden a ser más diversas en comparación con las de otras especies como *P. falciparum* (Arnott, Barry, y Reeder 2012), por lo cual la falta de intervención favorece tanto la propagación como la diferenciación del parásito, permitiendo así la aparición de nuevas clonas en la población. Sin embargo, es importante recalcar que a pesar de haber diversidad de clonas, las diferencias genéticas entre ellas no son grandes (Figs. 17-19).

Otro de los factores que mantendría los niveles de diversidad genética en la población parasitaria en cuestión sería la ocurrencia de desplazamientos por parte de los habitantes de la comunidad. Si bien queda claro el importante aislamiento de Santa Emilia con respecto a otras localidades, aun así, los pobladores se desplazan a los alrededores y otros ecosistemas dependiendo del tipo de actividad económica que realizan. Los agricultores se movilizan constantemente hacia sus chacras, las cuales pueden encontrarse tanto en los alrededores de la comunidad como a unos cuantos kilómetros de distancia. Por su parte, aquellos que trabajan como madereros suelen internarse alrededor de un mes en el bosque profundo antes de volver a la comunidad a proveer a sus familias. Asimismo, los pescadores se desplazan al río; mientras que un pequeño grupo de pobladores se desplaza cada cierto tiempo hasta la ciudad de Nauta para la venta de sus artesanías y otros productos (datos provistos por el personal de campo). En todos los casos mencionados, las personas ingresan con mayor o menor frecuencia en ecosistemas diferentes, donde es posible que puedan ser infectados con parásitos genéticamente distintos a aquellos circulantes dentro de la comunidad. Al retornar a casa portando estos nuevos parásitos, contribuirían a mantener los niveles locales de heterocigosidad, en concordancia con lo reportado por otros estudios (Sutton *et al.* 2009; Van den Eede, Van der Auwera, *et al.* 2010; Kosek *et al.* 2012; Delgado-Ratto *et al.* 2016). En efecto, el estudio de la diversidad genética y estructura poblacional del parásito se constituye como la base para detectar la presencia de “infecciones importadas”, y en estudios de mayor escala, para intentar rastrear el origen de estas (Ferreira y Rodrigues 2014).

Es así que los niveles de diversidad genética de *P. vivax* en Santa Emilia son comparables a los encontrados en localidades cercanas a la ciudad de Iquitos y, aquellas comunidades que a pesar de ser accesibles solo por vía fluvial, presentan

reportes de importantes movimientos poblacionales y flujo génico entre ellas (Delgado-Ratto *et al.* 2016). La heterocigosidad hallada en Santa Emilia fue mayor o menor sin que las diferencias lleguen a ser muy grandes, lo cual concuerda con los distintos niveles de transmisión y diversidad genética reportados previamente en este tipo de comunidades de la Amazonía Peruana (Sutton *et al.* 2009; Van den Eede, Van der Auwera, *et al.* 2010; Kosek *et al.* 2012; Delgado-Ratto *et al.* 2016). Sin embargo, al comparar Santa Emilia con una localidad con un grado de aislamiento geográfico más o menos similar (Van den Eede, Van der Auwera, *et al.* 2010; Van den Eede *et al.* 2011; Delgado-Ratto *et al.* 2014, Delgado-Ratto *et al.* 2016), la diversidad genética de la primera fue notablemente mayor, debido a las causas ya explicadas.

Con respecto a los estudios de diversidad genética de *P. vivax* en otros países, los microsatélites más usados corresponden tanto al panel de Karunaweera (Karunaweera *et al.* 2006; Ferreira *et al.* 2007; Van den Eede, Erhart, *et al.* 2010; Van Hong *et al.* 2016) como al panel de Imwong (Imwong, Snounou, *et al.* 2007; Imwong, Nair, *et al.* 2007; Kim *et al.* 2012). En el caso de aquellos que usaron los marcadores de Karunaweera, los niveles de diversidad genética fueron mayores a los encontrados en Perú (Tabla 7) debido principalmente a una menor intensidad de transmisión en nuestro país. Ciertamente, la cuenca amazónica peruana es tradicionalmente clasificada a nivel mundial como un escenario de baja transmisión (Alves *et al.* 2002; Vinetz y Gilman 2002; Roshanravan *et al.* 2003; Branch *et al.* 2005; Chuquiyauri *et al.* 2012; da Silva-Nunes *et al.* 2012; Rosas-Aguirre *et al.* 2016). Por otro lado, hacer la comparación con los estudios que usaron los marcadores de Imwong fue mucho más difícil, ya que la mayoría de ellos no proporcionaba valores de H_e para cada uno de los marcadores (Tabla 8). Además, los resultados fueron mucho más variables, incluso cuando se trataba de la misma localidad, como en el caso de Calcuta, India (Imwong, Snounou, *et al.* 2007; Imwong, Nair, *et al.* 2007; Kim

et al. 2012) y Bangkok, Tailandia (Imwong, Snounou, *et al.* 2007; Imwong, Nair, *et al.* 2007). Debido a esto, no se pudo encontrar un patrón específico que explicara las diferencias entre estas localidades y Santa Emilia.

El panel completo de marcadores reportados por Karunaweera consiste de 14 microsatélites (Karunaweera *et al.* 2006), de los cuales solo 5 fueron utilizados en este estudio (MS4, MS6, MS9, MS15 y MS20). Al revisar exhaustivamente la literatura se puede observar que estos son los marcadores que comúnmente proporcionan los mayores valores de *He*, tanto en la Amazonía peruana (Van den Eede, Van der Auwera, *et al.* 2010; Van den Eede *et al.* 2011; Delgado-Ratto *et al.* 2014, Delgado-Ratto *et al.* 2016) como en otros países (Karunaweera *et al.* 2006; Ferreira *et al.* 2007; Van den Eede, Erhart, *et al.* 2010; Van Hong *et al.* 2016). En efecto, los marcadores de este panel fueron los que proporcionaron la mayor *He* promedio cuando se evaluó los 3 paneles por separado. Por otro lado, el panel completo de marcadores de Imwong consiste de 9 microsatélites (Imwong, Nair, *et al.* 2007) de los cuales solo 4 fueron utilizados en este estudio (3.502, 11.162, 13.239 y 14.297) según lo recomendado por Sutton (Sutton 2013). Si bien este panel fue el que proporcionó la menor *He* promedio entre los 3 paneles, solo 2 de sus marcadores (3.502 y 13.239) presentaron baja diversidad mientras que los otros 2 presentaron valores similares al de la *He* promedio total de este estudio (Tabla 2). En el caso del panel de marcadores nuevos, solo 2 de ellos presentaron baja diversidad (Ch14.2986 y 14.3021) mientras que los otros 5 (Ch2.121, Ch2.122, Ch2.152, Ch14.2981 y Ch14.3010) presentaron mayor polimorfismo, obteniendo un valor de *He* promedio ubicado en medio de los obtenidos por los 2 paneles anteriores.

Desde una perspectiva crítica, no se puede decir que se recomienda descartar aquellos marcadores con baja diversidad para futuros estudios, ya que, si bien

presentaron un bajo nivel de polimorfismo en Santa Emilia, podrían presentar una mayor diversidad en otras localidades. Al ser la primera vez que se evalúan en la Amazonía Peruana tanto los marcadores de Imwong como los recientemente propuestos, surge la necesidad de complementar estos resultados con los de estudios posteriores dentro de la región que incluyan la evaluación de estos mismos marcadores.

Estudio	Miranda, 2017	Van den Eede et al ,2010a				Van den Eede et al, 2011	Delgado-Ratto et al, 2014	Delgado-Ratto et al, 2016
Localidad	Santa Emilia	Mazan	Moronacocha	Manacamiri, Lupuna, Fray Martin, San Pedro, Santa Rita	San Carlos	Manacamiri, Lupuna, Fray Martin, San Pedro, Santa Rita	San Carlos	25 localidades de la Amazonia Peruana
He (MS4)	0.48	0.73	0.81	0.36	0.55	0.44	0.65	0.70
He (MS6)	0.67	0.83	0.67	0.64	0.59	0.62	0.61	0.86
He (MS9)	0.72	0.56	0.69	0.74	0.59	0.77	0.66	0.82
He (MS15)	0.79	0.81	0.89	0.51	0.57	0.51	0.59	0.85
He (MS20)	0.78	0.77	0.89	0.75	0.59	0.72	0.65	0.88
Promedio (5 marcadores)	0.69	0.74	0.79	0.60	0.58	0.61	0.63	0.82
Promedio (todos los marcadores del estudio)	0.61	0.66	0.69	0.55	0.44	0.56	0.49	0.74

Tabla 6: Comparación de la diversidad genética (*He*) de Santa Emilia y la de otras localidades de la Amazonía Peruana utilizando los marcadores reportados por Karunaweera.

Estudio	Miranda, 2017	Karunaweera et al, 2006	Ferreira et al, 2007	Van den Eede et al, 2010b	Nguyen Van Hong et al, 2016
Localidad	Santa Emilia	Provincias del sur y noroeste de Sri Lanka	4 ciudades del Estado de Acre, Brasil	Comunidad rural en Vietnam	4 comunidades rurales en Vietnam
He (MS4)	0.48	0.75	-	0.87	0.73
He (MS6)	0.67	0.83	-	0.91	0.66
He (MS9)	0.72	0.8	-	0.88	0.31
He (MS15)	0.79	0.86	-	0.91	0.53
He (MS20)	0.78	0.91	-	0.81	0.68
Promedio (5 marcadores)	0.69	0.83	-	0.88	0.58
Promedio (todos los marcadores del estudio)	0.61	0.79	0.71	0.86	0.68

Tabla 7: Comparación de la diversidad genética (*He*) de Santa Emilia y la de otros países utilizando los marcadores reportados por Karunaweera.

Estudio	Miranda, 2017	Imwong et al, 2007a			Imwong et al, 2007b				Kim et al, 2012
Localidad	Santa Emilia	Dawei - Birmania	Bangkok - Tailandia	Calcuta - India	5 localidades de Colombia	Calcuta - India	Bangkok - Tailandia	Phalanxay - Laos	Calcuta - India
He (3.502)	0.39	0.17	0.12	0.18	-	-	-	-	0.86
He (11.162)	0.62	-	-	-	-	-	-	-	0.63
He (13.239)	0.47	-	-	-	-	-	-	-	-
He (14.297)	0.63	0.23	0.17	0.19	-	-	-	-	0.85
Promedio (4 marcadores)	0.53	0.20	0.15	0.19	-	-	-	-	0.78
Promedio (todos los marcadores del estudio)	0.61	0.18	0,14	0.20	0.79	0.72	0.76	0.75	0.77

Tabla 8: Comparación de la diversidad genética (*He*) de Santa Emilia y la de otros países utilizando los marcadores reportados por Imwong.

7.3. Desequilibrio de ligamiento

El alto nivel de desequilibrio de ligamiento encontrado en este estudio es similar al encontrado en otras poblaciones de *P. vivax* tanto de la Amazonía Peruana (Van den Eede, Van der Auwera, *et al.* 2010; Van den Eede *et al.* 2011; Delgado-Ratto *et al.* 2014, Delgado-Ratto *et al.* 2016) como de otras localidades de Sudamérica (Imwong, Nair, *et al.* 2007; Ferreira *et al.* 2007; Orjuela-Sánchez *et al.* 2009; Chenet *et al.* 2012; Batista *et al.* 2015; Koepfli *et al.* 2015). En base a las características de la población parasitaria presente en Santa Emilia, surgen 2 posibles explicaciones para los niveles de desequilibrio encontrados: endogamia e importación de clonas.

Como se mencionó anteriormente, la ausencia prolongada de programas de control de malaria en la comunidad ha favorecido la diferenciación del parásito, permitiendo la aparición de nuevos haplotipos que, sin embargo, no presentan mucha distancia genética entre ellos (Figs. 16-18). Además, la MOI encontrada reveló la poca probabilidad de encontrar clonas distintas del parásito en una persona infectada. Es así que, cuando los mosquitos ingieren constantemente gametos masculinos y femeninos del parásito que son genéticamente idénticos o muy similares entre sí, ocurriría el fenómeno de endogamia (Anderson *et al.* 2000). Esta situación mantendría el desequilibrio de ligamiento entre loci no ligados físicamente por varias generaciones, a pesar de la ocurrencia de reproducción sexual, y por ende recombinación, entre los parásitos (Karunaweera *et al.* 2008).

Por otro lado, también se mencionó la “importación de clonas” como una consecuencia importante de las actividades económicas de los pobladores de Santa Emilia. Entonces, cuando un pequeño grupo de nuevas clonas es introducido en la comunidad y entra en contacto con una población local que es mucho más

numerosa, es improbable que puedan mezclarse de manera íntegra, debido al efecto de la deriva génica sobre los alelos de las clonas introducidas (Ohta 1982). La presencia de 2 poblaciones genéticas no relacionadas, y que no han tenido el tiempo suficiente para homogenizarse es una causa común de desequilibrio de ligamiento (Anderson *et al.* 2000). En otras palabras, cuando se analiza la totalidad de parásitos presentes en la comunidad, se encuentra asociación significativa entre un grupo de alelos pertenecientes a la población local y entre otro grupo de alelos correspondiente a las clonas importadas, incrementando así los niveles de desequilibrio de ligamiento. Esta segunda explicación es respaldada por distintos estudios de la genética poblacional de *P. vivax* en la Amazonía que reportan una alta diversidad genética y una marcada diferenciación entre distintas localidades (Van den Eede, Van der Auwera, *et al.* 2010; Kosek *et al.* 2012; Delgado-Ratto *et al.* 2016).

7.4. Estructuración genético-poblacional

El análisis de estructuración genética reveló la presencia de al menos 2 *clusters* en la población de estudio. Sin embargo, la separación entre estos no queda completamente manifiesta cuando se realiza el DAPC para $K=2$. Por su parte, cuando $K=4$, se observa una mejor separación de los *clusters* en el DAPC; mientras que cuando $K=7$, la distribución de *clusters* parece no reflejar correctamente la estructura genética subyacente en la población.

La excesiva cercanía entre los *clusters* 1 y 5 cuando $K=7$ sugiere que el grado de subdivisión está sobreestimado. Es probable que estos 2 conformen realmente un solo *cluster* que está experimentando un fenómeno de expansión clonal, proceso mediante el cual se da una diferenciación incompleta entre 2 o más clonas

relacionadas, de manera que no llegan a constituirse como nuevas subpoblaciones genéticas (Balloux, Lehman y de Meeûs 2013). Además, la proporción de individuos con ascendencia mixta resulta ser excesiva (aprox. 40%) cuando se asume la presencia de 7 *clusters* (Fig. 14).

Por otro lado, los análisis de diversidad genética y desequilibrio de ligamiento respaldan la idea de que, si bien existen niveles de polimorfismo tales que no pueden ser explicados asumiendo la presencia de solo 2 subpoblaciones genéticas, las diferencias no son lo suficientemente grandes como para llegar a constituirse en 7. El análisis de asociación con factores epidemiológicos reafirmó que no existen diferencias significativas entre los *clusters* cuando $K=2$, mientras que el análisis para $K=7$ carece de poder estadístico debido a la subdivisión excesiva de la población muestral.

En base a los motivos expuestos anteriormente, se descartó la posibilidad de que existan 2 ó 7 subpoblaciones genéticas en Santa Emilia. Se propone que el número real de subpoblaciones presentes en la comunidad sería 4, las cuales provendrían de 2 linajes genéticos ancestrales. La ocurrencia de expansiones clonales por parte de haplotipos particulares sería responsable de la aparición de los 7 *clusters* detectados por el programa Structure.

7.5. Asociación de la estructuración genético-poblacional con las características epidemiológicas

Considerando la existencia de 4 subpoblaciones genéticas *en* Santa Emilia, se encontró asociación significativa entre los parásitos de la subpoblación 2 y los varones de la comunidad, mientras que los parásitos de la subpoblación 4 se asociaron con las personas que laboraban dentro de la comunidad. Ambas

observaciones se respaldan mutuamente puesto que, en Santa Emilia, de acuerdo a las costumbres de la población, las mujeres cumplen principalmente el rol de ama de casa, mientras que los varones son aquellos responsables de proporcionar el sustento a su familia. Por lo tanto, las mujeres pasan la mayor parte del tiempo dentro de la comunidad, mientras que los varones son quienes se desplazan constantemente fuera de ella para ejercer sus oficios. En base a estas premisas, podemos deducir que la subpoblación 2 estaría conformada principalmente por clonas importadas, mientras que la subpoblación 4 correspondería principalmente a parásitos locales.

Diversos estudios destacan el importante efecto que ejercen las actividades económicas de una comunidad sobre la diversidad genética y estructuración genético-poblacional de *P. vivax* (Sutton *et al.* 2009; Van den Eede, Van der Auwera, *et al.* 2010; Kosek *et al.* 2012; Delgado-Ratto *et al.* 2016). Desde una perspectiva más holística, las actividades económicas realizadas a la intemperie, junto con los constantes desplazamientos humanos entre sitios endémicos, juegan un rol fundamental en el mantenimiento de la transmisión de malaria en la Amazonía Peruana (Chuquiyaury *et al.* 2012).

7.6. Santa Emilia y la transmisión de *P. vivax* en la Amazonía Peruana

La gran proporción de infecciones asintomáticas y subpatentes detectadas en Santa Emilia se asemeja a la encontrada en numerosos estudios tanto en la Amazonía peruana (Roshanravan *et al.* 2003; Van den Eede *et al.* 2011), como en la Amazonía Brasileña (Alves *et al.* 2002; Suárez-Mutis *et al.* 2007; Barbosa *et al.* 2014) y en otros lugares del mundo (Mehlotra *et al.* 2000; Steenkeste *et al.* 2009; Kaiser *et al.* 2013).

En el caso específico de la Amazonía Peruana, donde la transmisión de *P. vivax* tiende a ser local y estructurada (Van den Eede, Van der Auwera, *et al.* 2010; Kosek *et al.* 2012; Delgado-Ratto *et al.* 2016), las infecciones constantes con clonas idénticas o muy similares conducirían al desarrollo de inmunidad adquirida en las personas (Longley *et al.* 2016; Mueller *et al.* 2013), modulando las cargas parasitarias a niveles que no son capaces de generar sintomatología ni son detectables por microscopía (Bousema *et al.* 2014).

En este contexto, si en algún momento los portadores asintomáticos de Santa Emilia (los cuales normalmente no son detectados ni reciben tratamiento) deciden migrar hacia otras comunidades, estos transportarían clonas del parásito ante las cuales los nuevos pobladores no han estado previamente expuestos, representando un riesgo importante para la reintroducción y mantenimiento de la enfermedad en otras localidades de la Amazonía (da Silva-Nunes *et al.* 2012).

Esta situación resalta la importancia de incluir a Santa Emilia en estudios de gran escala sobre la genética poblacional de *P. vivax* en la Amazonía Peruana, de manera que se pueda hacer una comparación directa de las clonas presentes en cada localidad. Identificar el origen y posibles rutas de transmisión de las distintas clonas del parásito es crucial para elaborar estrategias apropiadas de contención de la enfermedad (Escalante *et al.* 2015). Asimismo, interrumpir la transmisión a niveles locales sería importante para prevenir la constante reintroducción del parásito a lo largo de toda la región.

8. CONCLUSIONES

- Existe una alta diversidad genética de *P. vivax* en Santa Emilia, en el contexto de la Amazonía Peruana, debido a la ausencia prolongada de programas de control de malaria y a la constante importación de clonas.
- La ocurrencia de endogamia y la presencia de clonas importadas en la población parasitaria de Santa Emilia mantendrían los niveles significativos de desequilibrio de ligamiento encontrados en este estudio.
- En base a los diversos análisis realizados, el número más probable de subpoblaciones genéticas de *P. vivax* presente en esta comunidad es 4.
- Las actividades económicas realizadas por los habitantes de Santa Emilia, y los desplazamientos poblacionales que implican, juegan un rol importante en la estructuración genético-poblacional de *P. vivax* en esta comunidad.
- La alta proporción de infecciones asintomáticas, junto con la clonalidad de la población parasitaria, sugieren que Santa Emilia representaría un riesgo importante para la reintroducción y mantenimiento de la transmisión de malaria en la Amazonía Peruana.

9. LIMITACIONES

- La ausencia de detección activa de casos (DAC) en el mes abril redujo el tamaño de la población muestral, sin embargo, para los objetivos planteados en esta investigación no era primordial un seguimiento longitudinal tan riguroso, puesto que no se pretendía hacer una comparación de la diversidad genética a nivel mensual. Además, los cambios en la diversidad genética durante el desarrollo de los programas de intervención de malaria se dan de manera lenta.
- La incapacidad técnica de amplificar ADN proveniente de muestras con baja parasitemia conllevó a una reducción importante (del 43%) del número de muestras analizadas, por lo cual no se pudo incluir la temporada “Alta Transmisión 2014”.
- El decaimiento de la intensidad de transmisión junto con el efecto del tratamiento proporcionado fueron causantes de una reducción considerable (del 46%) en el número de infecciones correspondiente a la segunda mitad del periodo de estudio (con respecto a la primera mitad).

10. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar estudios longitudinales de diversidad genética y estructuración genético-poblacional en Santa Emilia, de tal manera que permitan:
 - Analizar el reemplazo de clonas o subpoblaciones genéticas a lo largo del tiempo.
 - Evaluar la respuesta inmune en los hospederos de acuerdo a cambios en la estructura genético-poblacional del parásito.
 - Evaluar cambios en la diversidad antigénica del parásito.
 - Evaluar el efecto de los programas de control de malaria en la comunidad.

- Se recomienda además incluir a localidades aisladas de la Amazonía Peruana en estudios genético-poblacionales a gran escala, de manera que permitan hacer una comparación directa de las clonas presentes en cada localidad, así como identificar el origen y posibles rutas de transmisión de las distintas clonas del parásito

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, F. P., R. R. Durlacher, M. J. Menezes, H. Krieger, L. H. Pereira Silva, y E. P. Camargo. 2002. "High Prevalence of Asymptomatic Plasmodium Vivax and Plasmodium Falciparum Infections in Native Amazonian Populations". *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 66 (6): 641–48.
- Anderson, T. J., B. Haubold, J. T. Williams, J. G. Estrada-Franco, L. Richardson, R. Mollinedo, M. Bockarie, *et al.* 2000. "Microsatellite Markers Reveal a Spectrum of Population Structures in the Malaria Parasite Plasmodium Falciparum". *Molecular Biology and Evolution* 17 (10): 1467–82.
- Anderson, T. J., X. Z. Su, M. Bockarie, M. Lagog, y K. P. Day. 1999. "Twelve Microsatellite Markers for Characterization of Plasmodium Falciparum from Finger-Prick Blood Samples". *Parasitology* 119 (Pt 2) (agosto): 113–25.
- Antinori, S., L. Galimberti, L. Milazzo, y M. Corbellino. 2012. "BIOLOGY OF HUMAN MALARIA PLASMODIA INCLUDING PLASMODIUM KNOWLESI". *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases* 4 (1): 2012013.
- Aramburú Guarda, J., C. Ramal Asayag, y R. Witzig. 1999. "Malaria Reemergence in the Peruvian Amazon Region". *Emerging Infectious Diseases* 5 (2): 209–15.
- Arnott, A., A. E. Barry, y J. C. Reeder. 2012. "Understanding the Population Genetics of Plasmodium Vivax Is Essential for Malaria Control and Elimination". *Malaria Journal* 11 (enero): 14.

- Balloux, F., L. Lehmann, y T. de Meeûs. 2003. "The Population Genetics of Clonal and Partially Clonal Diploids". *Genetics* 164 (4): 1635–44.
- Barbosa, S., A. B. Gozze, N. F. Lima, C. L. Batista, M. da Silva Bastos, V. C. Nicolete, P. S. Fontoura, *et al.* 2014. "Epidemiology of Disappearing Plasmodium vivax Malaria: A Case Study in Rural Amazonia". *PLOS Negl Trop Dis* 8 (8): e3109.
- Barry, A. E., A. Waltmann, C. Koepfli, C. Barnadas, e I. Mueller. 2015. "Uncovering the Transmission Dynamics of Plasmodium Vivax Using Population Genetics". *Pathogens and Global Health* 109 (3): 142–52.
- Batista, C. L., S. Barbosa, M. Da Silva Bastos, S. Ariane, S. Viana, y M. U. Ferreira. 2015. "Genetic Diversity of Plasmodium Vivax over Time and Space: A Community-Based Study in Rural Amazonia". *Parasitology* 142 (2): 374–84.
- Bhargava, A., y F. F. Fuentes. 2010. "Mutational Dynamics of Microsatellites". *Molecular Biotechnology* 44 (3): 250–66.
- Bousema, T., L. Okell, I. Felger, y C. Drakeley. 2014. "Asymptomatic Malaria Infections: Detectability, Transmissibility and Public Health Relevance". *Nature Reviews. Microbiology* 12 (12): 833–40.
- Branch, O., W. M. Casapia, D. Gamboa, J. N. Hernandez, F. F. Alava, N. Roncal, E. Alvarez, E. J. Perez, y E. Gotuzzo. 2005. "Clustered Local Transmission and Asymptomatic Plasmodium Falciparum and Plasmodium Vivax Malaria Infections in a Recently Emerged, Hypoendemic Peruvian Amazon Community". *Malaria Journal* 4 (junio): 27.
- Brito, C. F., y M. U. Ferreira. 2011. "Molecular Markers and Genetic Diversity of Plasmodium Vivax". *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 106 Suppl 1 (agosto): 12–26.

- Broquet, T., y E. J. Petit. 2009. "Molecular Estimation of Dispersal for Ecology and Population Genetics". *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 40 (1): 193–216.
- Buschiazzo, E., y N. J. Gemmell. 2006. "The Rise, Fall and Renaissance of Microsatellites in Eukaryotic Genomes". *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 28 (10): 1040–50.
- Carmona-Fonseca, J., G. Álvarez, y S. Blair. 2006. "Malaria por Plasmodium vivax: curación del ataque agudo con tres dosis diferentes de primaquina y dosis fija de cloroquina. Antioquia, Colombia, 2003-2004". *Biomédica* 26 (3): 353.
- Caterino, M. S., S. Cho, y F. A. Sperling. 2000. "The Current State of Insect Molecular Systematics: A Thriving Tower of Babel". *Annual Review of Entomology* 45: 1–54.
- Chenet, S. M. 2014. "Plasmodium Population Structure in the Context of Malaria Control and Elimination". Arizona State University.
- Chenet, S. M, K. A. Schneider, L. Villegas, y A. A. Escalante. 2012. "Local Population Structure of Plasmodium: Impact on Malaria Control and Elimination". *Malaria Journal* 11 (1): 412.
- Chistiakov, D. A., B. Hellemans, y F. A.M. Volckaert. 2006. "Microsatellites and Their Genomic Distribution, Evolution, Function and Applications: A Review with Special Reference to Fish Genetics". *Aquaculture* 255 (1-4): 1–29.
- Chuquiyaui, R., M. Paredes, P. Peñataro, S. Torres, S. Marin, A. Tenorio, K. C. Brouwer, *et al.* 2012. "Socio-Demographics and the Development of Malaria

Elimination Strategies in the Low Transmission Setting”. *Acta Tropica* 121 (3): 292–302.

Cornejo, O. E., y A. A. Escalante. 2006. “The Origin and Age of Plasmodium Vivax”. *Trends in Parasitology* 22 (12): 558–63.

Delgado-Ratto, C., D. Gamboa, V. E. Soto-Calle, P. Van den Eede, E. Torres, L. Sánchez-Martínez, J. Contreras-Mancilla, *et al.* 2016. “Population Genetics of Plasmodium Vivax in the Peruvian Amazon”. Editado por Alyssa E. Barry. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 10 (1): e0004376.

Delgado-Ratto, C., V. E Soto-Calle, P. Van den Eede, D. Gamboa, A. Rosas, E. N Abatih, H. Rodriguez Ferrucci, *et al.* 2014. “Population Structure and Spatio-Temporal Transmission Dynamics of Plasmodium Vivax after Radical Cure Treatment in a Rural Village of the Peruvian Amazon”. *Malaria Journal* 13 (1): 8.

Diermissen, E., y C. Yaeger. 2008. “MALARIA (Revisión Bibliográfica)”.

Dirección General de Epidemiología, Ministerio de Salud. 2009. “Sala situacional para el Análisis de Situación de Salud 2009 - SE52”. http://www.dge.gob.pe/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=428.

Dirección General de Epidemiología, Ministerio de Salud. 2016. “Sala situacional para el Análisis de Situación de Salud 2016 - SE52”. http://www.dge.gob.pe/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=591.

Dirección General de Epidemiología, Ministerio de Salud. 2017. “Sala situacional para el Análisis de Situación de Salud 2017 - SE27”.

http://www.dge.gob.pe/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=14&Itemid=121.

Earl, D. A., y B. M. von Holdt. 2012. "STRUCTURE HARVESTER: A Website and Program for Visualizing STRUCTURE Output and Implementing the Evanno Method". *Conservation Genetics Resources* 4 (2): 359–61.

Escalante, A. A., O. E. Cornejo, D. E. Freeland, A. C. Poe, E. Durrego, W. E. Collins, y A. A. Lal. 2005. "A Monkey's Tale: The Origin of Plasmodium Vivax as a Human Malaria Parasite". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (6): 1980–85.

Escalante, A. A., M. U. Ferreira, J. M. Vinetz, S. K. Volkman, L. Cui, D. Gamboa, D. J. Krogstad, *et al.* 2015. "Malaria Molecular Epidemiology: Lessons from the International Centers of Excellence for Malaria Research Network". *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 93 (3 Suppl): 79–86.

Escalante, A. A., D. E. Freeland, W. E. Collins, y A. A. Lal. 1998. "The Evolution of Primate Malaria Parasites Based on the Gene Encoding Cytochrome B from the Linear Mitochondrial Genome". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (14): 8124–29.

Evanno, G., S. Regnaut, y J. Goudet. 2005. "Detecting the Number of Clusters of Individuals Using the Software STRUCTURE: A Simulation Study". *Molecular Ecology* 14 (8): 2611–20.

Excoffier, L., G. Laval, y S. Schneider. 2007. "Arlequin (version 3.0): An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis". *Evolutionary Bioinformatics Online* 1 (febrero): 47–50.

- Ferreira, M. U., N. D. Karunaweera, M. da Silva-Nunes, N. S. da Silva, D. F. Wirth, y D. L. Hartl. 2007. "Population Structure and Transmission Dynamics of *Plasmodium Vivax* in Rural Amazonia". *The Journal of Infectious Diseases* 195 (8): 1218–26.
- Ferreira, M. U., y P. T. Rodrigues. 2014. "Tracking Malaria Parasites in the Eradication Era". *Trends in Parasitology* 30 (10): 465–66.
- Goldstein, D., y C. Schlotterer. 1999. *Microsatellites: Evolution and Applications*. United Kingdom: Oxford University Press.
- Goldstein, D. B., y D. D. Pollock. 1997. "Launching Microsatellites: A Review of Mutation Processes and Methods of Phylogenetic Interference". *The Journal of Heredity* 88 (5): 335–42.
- Graf, P. C. F., S. Durand, C. Alvarez Antonio, C. Montalvan, M. Galves Montoya, M. D. Green, M. L. Santolalla, *et al.* 2012. "Failure of Supervised Chloroquine and Primaquine Regimen for the Treatment of *Plasmodium Vivax* in the Peruvian Amazon". *Malaria Research and Treatment* 2012: 1–5.
- Greenhouse, B., A. Myrick, C. Dokomajilar, J. M. Woo, E. J. Carlson, P. J. Rosenthal, y G. Dorsey. 2006. "Validation of Microsatellite Markers for Use in Genotyping Polyclonal *Plasmodium Falciparum* Infections". *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 75 (5): 836–42.
- Guichoux, E., L. Lagache, S. Wagner, P. Chaumeil, P. Léger, O. Lepais, C. Lepoittevin, *et al.* 2011. "Current Trends in Microsatellite Genotyping". *Molecular Ecology Resources* 11 (4): 591–611.
- Hänscheid, T., y M. P. Grobusch. 2002. "How Useful Is PCR in the Diagnosis of Malaria?" *Trends in Parasitology* 18 (9): 395–98.

- Havryliuk, T., y M. U. Ferreira. 2009. "A Closer Look at Multiple-Clone Plasmodium Vivax Infections: Detection Methods, Prevalence and Consequences". *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 104 (1).
- Imwong, M. 2006. "Microsatellite Variation, Repeat Array Length, and Population History of Plasmodium Vivax". *Molecular Biology and Evolution* 23 (5): 1016–18.
- Imwong, M., G. Snounou, S. Pukrittayakamee, N. Tanomsing, J. R. Kim, A. Nandy, J. P. Guthmann, *et al.* 2007. "Relapses of Plasmodium Vivax Infection Usually Result from Activation of Heterologous Hypnozoites". *The Journal of Infectious Diseases* 195 (7): 927–33.
- Imwong, M., S. Nair, S. Pukrittayakamee, D. Sudimack, J. T. Williams, M. Mayxay, P. N. Newton, *et al.* 2007. "Contrasting Genetic Structure in Plasmodium Vivax Populations from Asia and South America". *International Journal for Parasitology* 37 (8-9): 1013–22.
- Jakobsson, M., y N. A. Rosenberg. 2007. "CLUMPP: A Cluster Matching and Permutation Program for Dealing with Label Switching and Multimodality in Analysis of Population Structure". *Bioinformatics* 23 (14): 1801–6.
- Jongwutiwes, S. 2005. "Mitochondrial Genome Sequences Support Ancient Population Expansion in Plasmodium Vivax". *Molecular Biology and Evolution* 22 (8): 1733–39.
- Kain, K. C., M. A. Harrington, S. Tennyson, y J. S. Keystone. 1998. "Imported Malaria: Prospective Analysis of Problems in Diagnosis and Management". *Clinical*

Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America 27 (1): 142–49.

Kaisar, M., T. Supali, A. E. Wiria, F. Hamid, L. J. Wammes, E. Sartono, A. Luty, *et al.* 2013. “Epidemiology of Plasmodium Infections in Flores Island, Indonesia Using Real-Time PCR”. *Malaria Journal* 12 (1): 169.

Kamvar, Z. N., J. C. Brooks, y N. J. Grünwald. 2015. “Novel R tools for analysis of genome-wide population genetic data with emphasis on clonality”. *Frontiers in Genetics* 6 (junio).

Kamvar, Z. N., J. F. Tabima, y N. J. Grünwald. 2014. “Poppr: An R Package for Genetic Analysis of Populations with Clonal, Partially Clonal, And/or Sexual Reproduction”. *PeerJ* 2: e281.

Karunaweera, N. D., M. U. Ferreira, A. Munasinghe, J. W. Barnwell, W. E. Collins, C. L. King, F. Kawamoto, D. L. Hartl, y D. F. Wirth. 2008. “Extensive Microsatellite Diversity in the Human Malaria Parasite Plasmodium Vivax”. *Gene* 410 (1): 105–12.

Karunaweera, N. D., M. U. Ferreira, D. L. Hartl, y D. F. Wirth. 2006. “Fourteen Polymorphic Microsatellite DNA Markers for the Human Malaria Parasite Plasmodium Vivax: PRIMER NOTE”. *Molecular Ecology Notes* 7 (1): 172–75.

Kim, J. R., A. Nandy, A. K. Maji, M. Addy, A. M. Dondorp, N. Day, S. Pukrittayakamee, N. J. White, y M. Imwong. 2012. “Genotyping of Plasmodium Vivax Reveals Both Short and Long Latency Relapse Patterns in Kolkata”. Editado por Steffen Borrmann. *PLoS ONE* 7 (7): e39645.

- Koepfli, C., P. T. Rodrigues, T. Antao, P. Orjuela-Sánchez, P. Van Den Eede, D. Gamboa, N. Van Hong, *et al.* 2015. "Plasmodium vivax diversity and population structure across four continents". Dryad Digital Repository.
- Kosek, M., P. P. Yori, R. H. Gilman, M. Calderon, M. Zimic, R. Chuquiyauri, C. Jeri, *et al.* 2012. "High Degree of Plasmodium Vivax Diversity in the Peruvian Amazon Demonstrated by Tandem Repeat Polymorphism Analysis". *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 86 (4): 580–86.
- Lee, M, C. Tan, L. Aw, C. Tang, M. Singh, S. Lee, H. Chia, y E. P. H. Yap. 2002. "Real-Time Fluorescence-Based PCR for Detection of Malaria Parasites". *Journal of Clinical Microbiology* 40 (11): 4343–45.
- Lehmann, T., W. A. Hawley, L. Kamau, D. Fontenille, F. Simard, y F. H. Collins. 1996. "Genetic differentiation of Anopheles gambiae populations from East and West Africa: comparison of microsatellite and allozyme loci". *Heredity* 77 (2): 192–200.
- Liu, W., Y. Li, K. S. Shaw, G. H. Learn, L. J. Plenderleith, J. A. Malenke, S. A. Sundararaman, *et al.* 2014. "African Origin of the Malaria Parasite Plasmodium Vivax". *Nature Communications* 5: 3346.
- Ljungqvist, M., M. åKesson, y B. Hansson. 2010. "Do Microsatellites Reflect Genome-Wide Genetic Diversity in Natural Populations? A Comment on Väli *et al.* (2008)". *Molecular Ecology* 19 (5): 851–55.
- Longley, R. J., J. Sattabongkot, e I. Mueller. 2016. "Insights into the Naturally Acquired Immune Response to Plasmodium Vivax Malaria". *Parasitology* 143 (2): 154–70.

- Mangold, K. A., R. U. Manson, E. S. C. Koay, L. Stephens, M. A. Regner, R. B. Thomson, L. R. Peterson, y K. L. Kaul. 2005. "Real-Time PCR for Detection and Identification of Plasmodium Spp". *Journal of Clinical Microbiology* 43 (5): 2435–40.
- Mehlotra, R. K., K. Lorry, W. Kastens, S. M. Miller, M. P. Alpers, M. Bockarie, J. W. Kazura, y P. A. Zimmerman. 2000. "Random Distribution of Mixed Species Malaria Infections in Papua New Guinea". *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 62 (2): 225–31.
- Mendis, K., B. J. Sina, P. Marchesini, y R. Carter. 2001. "The Neglected Burden of Plasmodium Vivax Malaria". *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 64 (1-2 Suppl): 97–106.
- de Meeûs, T., K. D. McCoy, F. Prugnolle, C. Chevillon, P. Durand, S. Hurtrez-Boussès, y F. Renaud. 2007. "Population Genetics and Molecular Epidemiology or How to 'débusquer La Bête'". *Infection, Genetics and Evolution* 7 (2): 308–32. doi:10.1016/j.meegid.2006.07.003.
- Milgroom, M. G. 1996. "RECOMBINATION AND THE MULTILOCUS STRUCTURE OF FUNGAL POPULATIONS". *Annual Review of Phytopathology* 34 (1): 457–77.
- Ministerio de Salud. 2007. "Norma Técnica de Salud para la Atención de Malaria y Malaria Grave en el Perú".
- de Monbrison, F., C. Angei, A. Staal, K. Kaiser, y S. Picot. 2003. "Simultaneous Identification of the Four Human Plasmodium Species and Quantification of Plasmodium DNA Load in Human Blood by Real-Time Polymerase Chain

- Reaction". *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 97 (4): 387–90.
- Moody, A. 2002. "Rapid Diagnostic Tests for Malaria Parasites". *Clinical Microbiology Reviews* 15 (1): 66–78.
- Mueller, I., M. R. Galinski, J. K. Baird, J. M. Carlton, D. K. Kochar, P. L. Alonso, y H. A. del Portillo. 2009. "Key Gaps in the Knowledge of Plasmodium Vivax, a Neglected Human Malaria Parasite". *The Lancet. Infectious Diseases* 9 (9): 555–66.
- Mueller, I., M. R. Galinski, T. Tsuboi, M. Arevalo-Herrera, W. E. Collins, y C. L. King. 2013. "Natural Acquisition of Immunity to Plasmodium Vivax: Epidemiological Observations and Potential Targets". *Advances in Parasitology* 81: 77–131.
- Mu, J., D. A. Joy, J. Duan, Y. Huang, J. Carlton, J. Walker, J. Barnwell, *et al.* 2005. "Host Switch Leads to Emergence of Plasmodium Vivax Malaria in Humans". *Molecular Biology and Evolution* 22 (8): 1686–93.
- Nei, M., y A. K. Roychoudhury. 1974. "Sampling Variances of Heterozygosity and Genetic Distance". *Genetics* 76 (2): 379–90.
- Nyachio, A., C. Van Overmeir, T. Laurent, J. C. Dujardin, y U. D'Alessandro. 2005. "Plasmodium Falciparum Genotyping by Microsatellites as a Method to Distinguish between Recrudescence and New Infections". *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 73 (1): 210–13.
- Ohta, T. 1982. "Linkage Disequilibrium due to Random Genetic Drift in Finite Subdivided Populations". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 79 (6): 1940–44. doi:10.1073/pnas.79.6.1940.

- Orjuela-Sánchez, P., N. S. da Silva, M. da Silva-Nunes, y M. U. Ferreira. 2009. "Recurrent Parasitemias and Population Dynamics of Plasmodium Vivax Polymorphisms in Rural Amazonia". *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 81 (6): 961–68.
- PAHO. 2009. "Report on the Situation of Malaria in the Americas, 2008". Washington DC: Pan American Health Organization.
- Patsoula, E., G. Spanakos, D. Sofianatou, M. Parara, y N. C. Vakalis. 2003. "A Single-Step, PCR-Based Method for the Detection and Differentiation of Plasmodium Vivax and P. Falciparum". *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 97 (1): 15–21.
- Payne, D. 1988. "Use and Limitations of Light Microscopy for Diagnosing Malaria at the Primary Health Care Level". *Bulletin of the World Health Organization* 66 (5): 621–26.
- Peakall, R., y P. E. Smouse. 2006. "Genalex 6: Genetic Analysis in Excel. Population Genetic Software for Teaching and Research". *Molecular Ecology Notes* 6 (1): 288–95.
- Price, R. N., E. Tjitra, C. A. Guerra, S. Yeung, N. J. White, y N. M. Anstey. 2007. "Vivax Malaria: Neglected and Not Benign". *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 77 (6 Suppl): 79–87.
- Restrepo, E., M. Imwong, W. Rojas, J. Carmona-Fonseca, y A. Maestre. 2011. "High Genetic Polymorphism of Relapsing P. Vivax Isolates in Northwest Colombia". *Acta Tropica* 119 (1): 23–29.


- Roderick, G. K. 1996. "Geographic Structure of Insect Populations: Gene Flow, Phylogeography, and Their Uses". *Annual Review of Entomology* 41: 325–52.
- Rosas-Aguirre, A., D. Gamboa, P. Manrique, J. E. Conn, M. Moreno, A. G. Lescano, J. F. Sanchez, *et al.* 2016. "Epidemiology of Plasmodium Vivax Malaria in Peru". *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 95 (6 Suppl): 133–44.
- Rosenberg, N. A. 2003. "Distruct: A Program for the Graphical Display of Population Structure: PROGRAM NOTE". *Molecular Ecology Notes* 4 (1): 137–38.
- Roshanravan, B., E. Kari, R. H. Gilman, L. Cabrera, E. Lee, J. Metcalfe, M. Calderon, *et al.* 2003. "Endemic Malaria in the Peruvian Amazon Region of Iquitos". *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 69 (1): 45–52.
- Ruebush, T. K., J. Zegarra, J. Cairo, E. M. Andersen, M.I Green, D. R. Pillai, W. Marquiño, *et al.* 2003. "Chloroquine-Resistant Plasmodium Vivax Malaria in Peru". *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 69 (5): 548–52.
- Rutledge, G. G., U. Böhme, M. Sanders, A. J. Reid, J. A. Cotton, O. Maiga-Ascofare, A. A. Djimdé, *et al.* 2017. "Plasmodium malariae and P. ovale genomes provide insights into malaria parasite evolution". *Nature* 542 (7639): 101–4.
- Sambrook, J. y M. Green. 2012. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Fourth Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schlötterer, C. 2001. "Genealogical Inference of Closely Related Species Based on Microsatellites". *Genetics Research* 78 (03): 209.

- da Silva-Nunes, M., M. Moreno, J. E. Conn, D. Gamboa, S. Abeles, J. M. Vinetz, y M. U. Ferreira. 2012. "Amazonian Malaria: Asymptomatic Human Reservoirs, Diagnostic Challenges, Environmentally Driven Changes in Mosquito Vector Populations, and the Mandate for Sustainable Control Strategies". *Acta Tropica* 121 (3): 281–91.
- Slatkin, M.. 2008. "Linkage Disequilibrium--Understanding the Evolutionary Past and Mapping the Medical Future". *Nature Reviews. Genetics* 9 (6): 477–85.
- de Souza-Neiras, W., L. M. Storti de Melo, y R. L. Dantas Machado. 2007. "The genetic diversity of *Plasmodium vivax*: a review". *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102 (3): 245–54.
- Steenkeste, N., S. Incardona, S. Chy, L. Duval, M. T. Ekala, P. Lim, S. Hewitt, *et al.* 2009. "Towards High-Throughput Molecular Detection of *Plasmodium*: New Approaches and Molecular Markers". *Malaria Journal* 8 (1): 86.
- Suárez-Mutis, M. C., P. Cuervo, F. Leoratti, S. L. Moraes-Avila, A. W. Ferreira, O. Fernandes, y J. Rodrigues Coura. 2007. "Cross sectional study reveals a high percentage of asymptomatic *Plasmodium vivax* infection in the Amazon Rio Negro area, Brazil". *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 49 (3): 159–64.
- Sunnucks, P. 2000. "Efficient Genetic Markers for Population Biology". *Trends in Ecology & Evolution* 15 (5): 199–203.
- Sutton, P. L. 2013. "A Call to Arms: On Refining *Plasmodium Vivax* Microsatellite Marker Panels for Comparing Global Diversity". *Malaria Journal* 12 (1): 447.
- Sutton, P. L., V. Neyra, J. N. Hernandez, y O. H. Branch. 2009. "*Plasmodium Falciparum* and *Plasmodium Vivax* Infections in the Peruvian Amazon:

- Propagation of Complex, Multiple Allele-Type Infections without Super-Infection". *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 81 (6): 950–60.
- Tautz, D. 1989. "Hypervariability of Simple Sequences as a General Source for Polymorphic DNA Markers". *Nucleic Acids Research* 17 (16): 6463–71.
- Taylor, J. W., D. M. Geiser, A. Burt, y V. Koufopanou. 1999. "The Evolutionary Biology and Population Genetics Underlying Fungal Strain Typing". *Clinical Microbiology Reviews* 12 (1): 126–46.
- Tibayrenc, M. 1999. "Toward an Integrated Genetic Epidemiology of Parasitic Protozoa and Other Pathogens". *Annual Review of Genetics* 33 (1): 449–77.
- Tibayrenc, M., y F. J. Ayala. 2002. "The Clonal Theory of Parasitic Protozoa: 12 Years on". *Trends in Parasitology* 18 (9): 405–10.
- Tran, T. M., A. Aghili, S. Li, A. Ongoiba, K. Kayentao, S. Doumbo, B. Traore, y P. D. Crompton. 2014. "A Nested Real-Time PCR Assay for the Quantification of Plasmodium Falciparum DNA Extracted from Dried Blood Spots". *Malaria Journal* 13 (1): 393.
- Tsitrone, A., F. Rousset, y P. David. 2001. "Heterosis, Marker Mutational Processes and Population Inbreeding History". *Genetics* 159 (4): 1845–59.
- Van den Eede, P., A. Erhart, G. Van der Auwera, C.I Van Overmeir, N. D. Thang, L. X. Hung, J. Anné, y U. D'Alessandro. 2010. "High Complexity of Plasmodium Vivax Infections in Symptomatic Patients from a Rural Community in Central Vietnam Detected by Microsatellite Genotyping". *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 82 (2): 223–27.

- Van den Eede, P., V. E. Soto-Calle, C. Delgado, D. Gamboa, T. Grande, H. Rodriguez, A. Llanos-Cuentas, J. Anné, U. D'Alessandro, y A. Erhart. 2011. "Plasmodium Vivax Sub-Patent Infections after Radical Treatment Are Common in Peruvian Patients: Results of a 1-Year Prospective Cohort Study". *PloS One* 6 (1): e16257.
- Van den Eede, P., G. Van der Auwera, C. Delgado, T. Huyse, V. E. Soto-Calle, D. Gamboa, T. Grande, *et al.* 2010. "Multilocus Genotyping Reveals High Heterogeneity and Strong Local Population Structure of the Plasmodium Vivax Population in the Peruvian Amazon". *Malaria Journal* 9 (junio): 151.
- Van Hong, N., C. Delgado-Ratto, P. V. Thanh, P. Van den Eede, P. Guetens, N. T. Huong Binh, B. Q. Phuc, *et al.* 2016. "Population Genetics of Plasmodium Vivax in Four Rural Communities in Central Vietnam". Editado por Joseph M. Vinetz. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 10 (2): e0004434.
- Vargas Herrera, J. 2003. "Prevención y control de la Malaria y otras enfermedades transmitidas por vectores en el Perú". *Revista Peruana de Epidemiología*.
- Vinetz, J. M., y R. H. Gilman. 2002. "Asymptomatic Plasmodium Parasitemia and the Ecology of Malaria Transmission". *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 66 (6): 639–40.
- WHO. 2015. "World Malaria Report". http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/wmr2015-keypoints_eng.pdf?ua=1.
- WHO. 2016. "World Malaria Report". <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2016/report/en/>.
- WHO. 2017. "A framework for malaria elimination". <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241511988/en/>.

12. ANEXOS

**UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA**

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

CONSTANCIA

El que suscribe, Presidente del Comité Institucional de Ética (CIE) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia certifica que luego de haberse realizado las modificaciones solicitadas en sesión del CIE de fecha 18 de setiembre del 2012 al Proyecto de Investigación titulado: "Transmisión de la malaria en comunidades lejanas de la Región Amazónica del Perú" Versión recibida en fecha 12 de setiembre del 2012, código de inscripción 60429, presentado por los Investigadores Principales, Raul Chuquiyaui Haro, Alejandro Llanos Cuentas, Joseph Vinetz.

Considerando que:

1. El protocolo de investigación sigue los lineamientos científicos y éticos, con balance favorable entre riesgos y beneficios.
2. El equipo investigador se encuentra calificado para su ejecución.
3. Los Consentimientos Informados y Asentimientos brindan la información necesaria de manera adecuada y permiten el enrolamiento voluntario de los participantes.
4. Están contemplados mecanismos de confidencialidad de los datos.

De acuerdo a los estándares propuestos por la Universidad.

Por lo tanto, el CIE acuerda **EXPEDIR LA APROBACION**, en fecha 23 de octubre del 2012 por seguir las Guías de Buenas Prácticas Clínicas.


Documentos incluidos en esta aprobación:

- ✓ Protocolo de investigación, versión 2.0 de fecha 24 de setiembre 2012
- ✓ Consentimiento Informado para participantes Adultos, versión 2.0, de fecha 24 de setiembre 2012.
- ✓ Consentimiento Informado para padres de participantes menores de 18 años, versión 2.0 de fecha 24 de setiembre 2012
- ✓ Asentimiento Informado para participantes de 7 a 12 años, versión 2.0 de fecha 24 de setiembre 2012
- ✓ Asentimiento Informado para participantes de 12 a 17 años, versión 2.0 de fecha 24 de setiembre 2012

Cualquier enmienda al protocolo original, así como la ocurrencia de alguna eventualidad que afecte adversamente a los participantes, deberá ser reportada en breve plazo a este Comité.

Carmin B. Medina
26 - Oct. 2012

Av. Honorio Delgado 430, Lima 31 / Apartado Postal 4314, Lima 100, Telefax: 482-4401
Teléfono: 319-0000 Anexo: 2271 / 2542
e-mail: duict@oficinas-upch.pe http://www.upch.edu.pe/vrinve/duict/



Anexo 1: Constancia de aprobación del Comité de Ética.

Grupo	MS	Motivo	Cromosoma	Primer forward	Primer reverse	T. bp	[] nm	T° a	Dilución ABI	Reportado
1	11.162	ATAC	Pv_Sal1_chr11	6FAM-TTTGTTAGGAGATCCGCTCG	TAAATGACACTTTGGCTTCC	167-215	200	60	1:10	Imwong et al 2007
1	Ch2.121	TTA	Pv_Sal1_chr02	NED-CCTTGCTCTCTGGCTCTTC	GTATGAGTGACCACCTGGC	157-199	200	67	1:10	Laboratorio malaria UPCH
1	14.297	AAG	Pv_Sal1_chr14	PET-TACACCCCTTAGGTCCTCGT	TGAAAAATGTTCCGCTACTT	191-215	200	57	1:10	Imwong et al 2007
2	Ch14.3021	TA	Pv_Sal1_chr14	6FAM-GCATTGTACATTGTTTCGT	GCAAGATGTGCTTTTACA	203-259	400	57	1:20	Laboratorio malaria UPCH
2	Ch14.2986	AT	Pv_Sal1_chr14	NED-TTCCTAAATAAGCACCATG	ACCATTCTGTAAAATGTATGT	165-171	200	57	1:20	Laboratorio malaria UPCH
2	Ch14.3010	AT	Pv_Sal1_chr14	PET-GATAAGATAAAACAATAATGCG	AGGATGCTTCGGTTTGCT	198-235	200	60	1:10	Laboratorio malaria UPCH
3	MS9	(GGA)18	Pv_Sal1_chr08	6FAM-AGATGCCTACACGTTGACGA	CTGTCTTGAAGCTGCCATGTGGTAAT	148-181	200	57	1:20	Karunaweera et al 2006
3	13.239	TTTA	Pv_sal1_chr13	NED-CAACAACAAAATGAATGACG	CCTACCTTACGCGTTTTTA	182-194	200	58	1:20	Imwong et al 2007
3	Ch14.2981	AT	Pv_Sal1_chr14	PET-CGATGAATCATTTTCGTCGCA	ACTCTCTTTTCAGCACTTTTGGC	126-158	400	63	1:20	Laboratorio malaria UPCH
3	MS6	(TCC)2(TCT)3(CCT)2(TCC)2 GCTTCT(TCC)10	Pv_Sal1_chr11	VIC-GGTCTTCGGTGATCTCTGC	CTGTCTTGAGGACATCAACGGGATT	209-245	200	57	1:15	Karunaweera et al 2006
4	MS15	(TCT)10	Pv_Sal1_chr05	NED-TGTTTGCAAAGGAATCCACA	CTGTCTCGCCAGATGAAAAGGATAA	217-295	400	57	1:10	Karunaweera et al 2006
4	3.502	AACGGATG	Pv_sal1_chr3	PET-GTGGACCGATGGACCTAT	TCCTACTCAGGGGAATACT	136-176	400	55	1:20	Imwong et al 2007
4	MS20	(GAA)11GAG(GAA)13(CAA) 4 GAA(CAA)5	Pv_Sal1_chr10	VIC-GCACAACAAATGCAAGATCC	CTGTCTTGCCAGTGGCTCATCTCT	200-240	200	60	1:20	Karunaweera et al 2006
5	Ch2.122	ATA	Pv_Sal1_chr02	NED-AGCTGGATTGCCCTAAGTGC	CGCATCATGCATACGCTTG	188-209	200	60	1:20	Laboratorio malaria UPCH
5	MS4	(AGT)18	Pv_Sal1_chr06	PET-CGATTTACTGTTGACGCTGAA	CTGTCTCAAAGGAACATGCTCGATGA	187-220	200	57	1:20	Karunaweera et al 2006
5	Ch2.152	AAT	Pv_Sal1_chr02	VIC-GTCATTTTCTAGGCAAAGACGC	TACGTTTCGCCATGTTCTCG	104-211	400	63	1:20	Laboratorio malaria UPCH

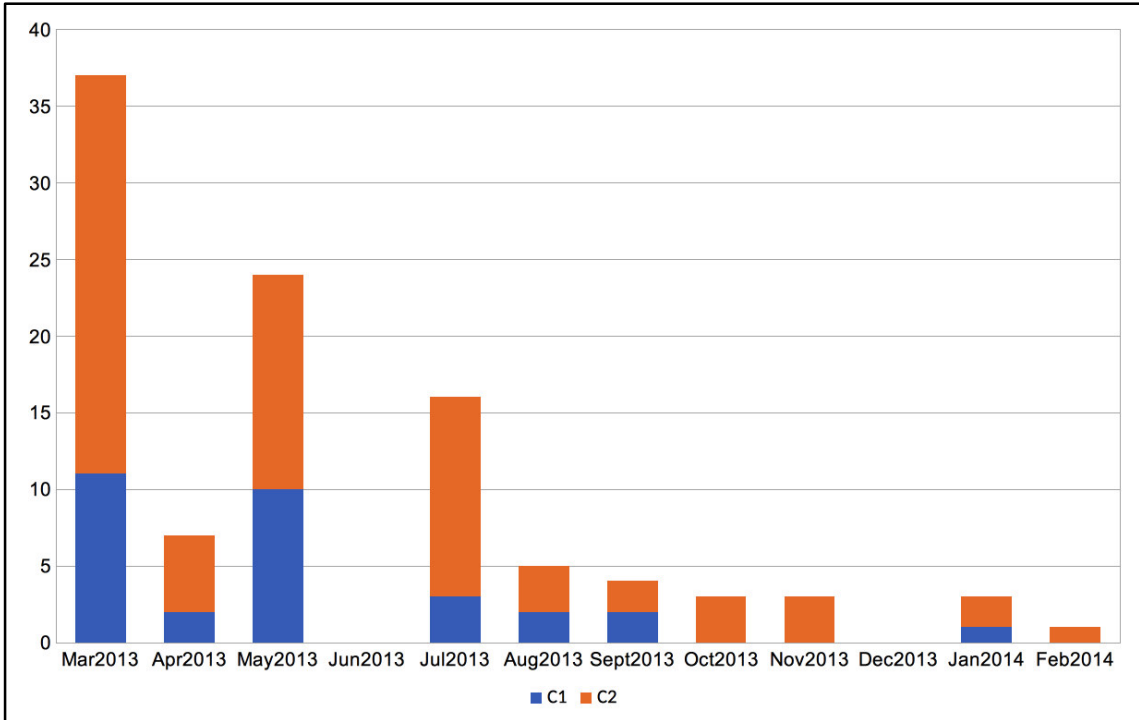
Anexo 2: Lista de marcadores y primers utilizados para la amplificación de microsatélites de *P. Vivax*.

Locus	N° Alelos	He	Uniformidad
Ch2.121	6	0.73	0.79
Ch2.122	3	0.47	0.68
Ch2.152	10	0.80	0.73
3.502	4	0.36	0.55
MS15	8	0.79	0.81
MS4	5	0.53	0.57
MS9	7	0.75	0.80
MS20	6	0.76	0.85
MS6	5	0.68	0.74
11.162	5	0.67	0.80
13.239	2	0.50	0.98
14.297	6	0.66	0.69
Ch14.2981	4	0.63	0.86
Ch14.2986	2	0.35	0.76
Ch14.3010	6	0.72	0.75
Ch14.3021	3	0.47	0.83
Promedio	5.12	0.62	0.76

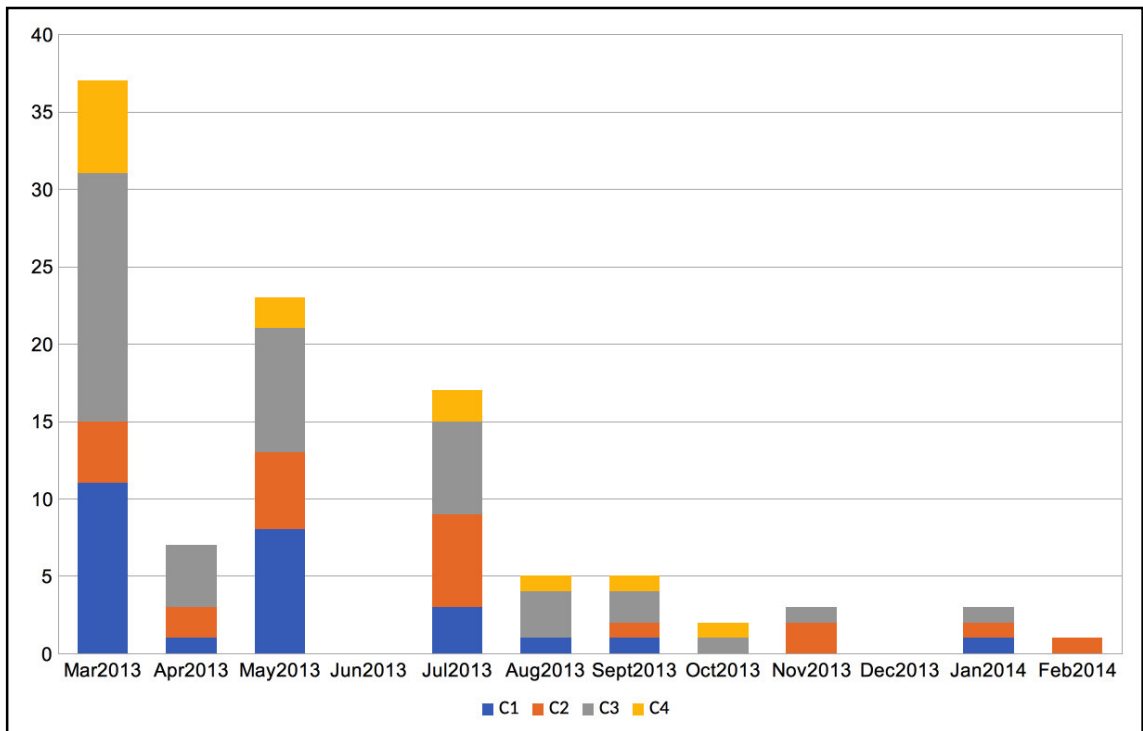
Anexo 3: Diversidad genética por locus en la temporada “Alta Transmisión”.

Locus	N° Alelos	He	Uniformidad
Ch2.121	7	0.76	0.79
Ch2.122	4	0.62	0.78
Ch2.152	8	0.81	0.78
3.502	3	0.42	0.71
MS15	5	0.79	0.92
MS4	5	0.39	0.49
MS9	3	0.66	0.94
MS20	7	0.82	0.87
MS6	5	0.66	0.69
11.162	5	0.48	0.57
13.239	2	0.39	0.80
14.297	4	0.59	0.69
Ch14.2981	3	0.60	0.85
Ch14.2986	2	0.29	0.68
Ch14.3010	5	0.63	0.66
Ch14.3021	4	0.47	0.68
Promedio	4.50	0.59	0.74

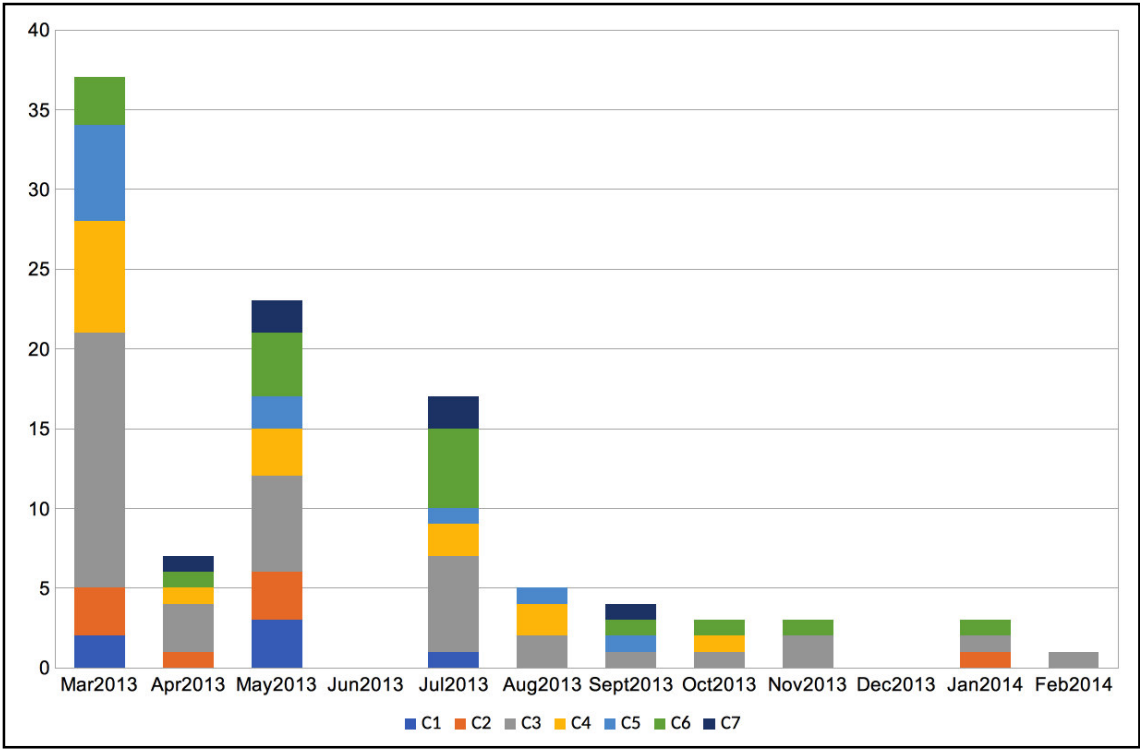
Anexo 4: Diversidad genética por locus en la temporada “Baja Transmisión”.



Anexo 5: Distribución de clusters por mes asumiendo K=2.



Anexo 6: Distribución de clusters por mes asumiendo K=4.



Anexo 7: Distribución de clusters por mes asumiendo K=7.

13. GLOSARIO

Alelo: Estado hereditario en el que puede estar un locus. En diploides, cada individuo tiene dos alelos por locus, los que pueden ser idénticos (homocigotos) o diferentes (heterocigotos).

Clona: Cada una de las diferentes cepas de un parásito definida por el haplotipo que presenta.

Cluster: Agrupamiento de individuos en base a sus similitudes genéticas.

Codominante: Describe un marcador genético donde todos los heterocigotos son reconocibles de todos los homocigotos.

Deriva genética: Describe el proceso por el cual las frecuencias alélicas cambian de una generación a otra como resultado del muestreo aleatorio de individuos (cigotos o gametos que forman cigotos/adultos) que sobreviven para formar la siguiente generación en una población de tamaño finito.

Desequilibrio de ligamiento: Asociación no aleatoria entre diferentes loci (generalmente en pares). Muchos factores diferentes (estructura de la población, sistemas cerrados de apareamiento, selección, etc.) pueden generar y mantener asociaciones estadísticas entre los loci.

Diploide: Organismo o célula con dos juegos de material genético nuclear (cromosomas), a excepción de los cromosomas sexuales cuando los hay.

Endogamia (consanguinidad): Apareamiento entre individuos de ascendencia común ya sea por comportamientos propios de estos o por tamaños poblacionales limitados. Esto genera una proporción significativa de alelos idénticos por descendencia en los individuos.

Estructuración genético-poblacional: ¹Se refiere a la distribución de la diversidad genética (genotipos, alelos, o haplotipos) en el espacio y tiempo, dentro y entre las poblaciones de una especie. Está determinada por procesos genéticos como la selección, recombinación, mutación, deriva génica y flujo génico. ²Fenómeno en el cual existen suficientes diferencias genéticas para definir la presencia de 2 o más subpoblaciones en un grupo de individuos.

Fenotipo: La expresión de un carácter (por ejemplo, el color de los ojos), el cual puede estar determinado tanto por la información genética que porta un individuo (genotipo) como la influencia que ejerce el ambiente sobre este.

Genotipo: Conjunto completo de alelos mostrados por un individuo en un locus específico o un conjunto específico de loci (cuando se especifica).

Haploide: Organismo o célula con un solo juego de material genético nuclear (cromosomas).

Haplotipo: Conjunto de alelos pertenecientes a distintos loci que le brindan un carácter diferencial a un individuo a nivel molecular.

Heterocigoto: Se refiere a un locus en un individuo diploide para el cual los dos alelos son diferentes.

Homocigoto: Se refiere a un locus en un individuo diploide para el cual los dos alelos son idénticos.

Locus: Describe una porción de ADN en una posición específica en el genoma. No corresponde necesariamente a un gen.

Loci: Plural de locus.

Multiplicidad de infección: Número de parásitos distintos (distinto haplotipo) que se encuentran infectando un individuo.

Mutación: Proceso en el cual se comete un error durante la duplicación del ADN.

Neutral: Se aplica a un locus cuyo polimorfismo no se encuentra bajo ningún tipo de presión selectiva.

Patente: Infección que puede ser detectada tanto por microscopía como por diagnóstico molecular.

Polimorfismo: Condición que describe la variación genética (presencia de más de un alelo) en un locus determinado.

Población: Conjunto de individuos que comparten los mismos parámetros demográficos (regulación de la población) y que muy probablemente comparten una ascendencia común en comparación con los miembros de otras poblaciones de este tipo, con excepción de los migrantes.

Propagación clonal: Reproducción en la que la descendencia es idéntica a los individuos parentales.

Subpatente (Submicroscópica): Infección que solo puede ser detectada por diagnóstico molecular y no por microscopía.