

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**UNIDAD DE POSGRADO**

**Patrones de recurrencia y resistencia asociadas a la  
variabilidad genética de *Plasmodium vivax* durante la  
malaria asintomática en la localidad de Mazán-Iquitos**

**TESIS**

Para optar el Grado Académico de Magister en Biología Molecular

**AUTOR**

Edward Valencia Ayala

**Lima – Perú**

**2012**

## LISTA DE ABREVIACIONES

|                      |  |
|----------------------|--|
| <b>aa:</b>           | <b>Aminoácidos</b>   |
| <b><i>Alu I:</i></b> | <b>Enzima de restricción <i>Arthrobacter luteus</i></b>      |
| <b>ATP:</b>          | <b>Adenosina de Tri-Fosfato</b>                              |
| <b>COI:</b>          | <b>Complejidad de la infección</b>                           |
| <b>CQR:</b>          | <b>Cloroquino-resistencia</b>                                |
| <b>Ct:</b>           | <b>Ciclo de <i>threshold</i></b>                             |
| <b>DIRESA:</b>       | <b>Dirección Regional de Salud</b>                           |
| <b>DNA:</b>          | <b>Ácido desoxiribonucleotido</b>                            |
| <b>dNTPs:</b>        | <b>Desoxinucleótidos</b>                                     |
| <b>EDTA:</b>         | <b>Ácido etilendiaminotetraacético</b>                       |
| <b>E/K:</b>          | <b>Cambio de Glutamina por Lisina</b>                        |
| <b>F/L:</b>          | <b>Cambio de Fenilalanina por Leucina</b>                    |
| <b>GG:</b>           | <b>Gota gruesa</b>   |
| <b>Hd:</b>           | <b>Haplotipo diferente</b>                                   |
| <b><i>Hha I:</i></b> | <b>Enzima de restricción <i>Haemophilus haemolyticus</i></b> |
| <b>Hhe:</b>          | <b>Hipnozoito heterólogo</b>                                 |
| <b>Hho:</b>          | <b>Hipnozoito homólogo</b>                                   |
| <b>Hi:</b>           | <b>Haplotipo idéntico</b>                                    |
| <b>HRM:</b>          | <b>High resolution melting</b>                               |
| <b>IAP:</b>          | <b>Índice parasitario anual</b>                              |
| <b>IC50:</b>         | <b>Coefficiente de inhibición media</b>                      |
| <b>IPTG:</b>         | <b>Isopropiltio-<math>\beta</math>-D-galactósido</b>         |
| <b>KD:</b>           | <b>Kilodaltons</b>   |
| <b>LB:</b>           | <b>Medio Luria-Bertani</b>                                   |
| <b>L/L:</b>          | <b>Sin cambio de aminoácido Leucina</b>                      |
| <b>OD:</b>           | <b>Densidad óptica</b>                                       |
| <b>MDR1:</b>         | <b>Proteína multidrogo resistente</b>                        |
| <b>MgCl2:</b>        | <b>Cloruro de magnesio</b>                                   |

|   |  |
|---|--|
| <b>MINSA:</b>                             | <b>Ministerio de Salud</b>   |
| <b>MSP3-<math>\alpha</math>:</b>          | <b>Proteína se superficie del merozoito</b>                        |
| <b>M/T:</b>                               | <b>Cambio de Metionina por Treonina</b>                            |
| <b>ng:</b>                                | <b>Nanogramos</b>  |
| <b>nM:</b>                                | <b>Nanomolar</b>   |
| <b>NBD:</b>                               | <b>Nucleotide Binding Dominion</b>                                 |
| <b>OMS:</b>                               | <b>Organización Mundial de la Salud</b>                            |
| <b>ORF:</b>                               | <b>Open Read Frame</b>   |
| <b>pb:</b>                                | <b>Pares de bases</b>  |
| <b><i>pfmdr1</i>:</b>                     | <b>Gen mutidrogoresistente de <i>Plasmodium falciparum</i></b>     |
| <b>PLD:</b>                               | <b>Nivel de la diversidad poblacional</b>                          |
| <b><i>pvald1</i>:</b>                     | <b>Gen aldolasa de <i>Plasmodium vivax</i></b>                     |
| <b><i>pvmdr1</i>:</b>                     | <b>Gen mutidrogoresistente de <i>Plasmodium vivax</i></b>          |
| <b><i>pvmsp3-<math>\alpha</math></i>:</b> | <b>Gen de la proteína de superficie del merozoito</b>              |
| <b>qPCR:</b>                              | <b>Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativo</b>            |
| <b>RENACE:</b>                            | <b>Red Nacional de Control Epidemiológico</b>                      |
| <b>RFLP:</b>                              | <b>Patrones de longitud de fragmentos de restricción</b>           |
| <b>RNA:</b>                               | <b>Ácido ribonucleico</b>  |
| <b>RQ:</b>                                | <b>Cuantificación Relativa</b>                                     |
| <b>SE:</b>                                | <b>Semana Epidemiológica</b>                                       |
| <b>SNPs:</b>                              | <b>Polimorfismos de nucleótidos únicos.</b>                        |
| <b>SVE:</b>                               | <b>Servicio de Vigilancia Epidemiológica</b>                       |
| <b>Taq:</b>                               | <b><i>Thermus acuaticus</i></b>                                    |
| <b>TMDs:</b>                              | <b>Dominios transmembrana</b>                                      |
| <b>TRM:</b>                               | <b>Transmembrana</b>   |
| <b><math>\mu</math>g:</b>                 | <b>Microgramos</b>   |
| <b><math>\mu</math>l:</b>                 | <b>Microlitros</b>   |
| <b><math>\mu</math>M:</b>                 | <b>Micromolar</b>  |
| <b>UV:</b>                                | <b>Ultravioleta</b>  |
| <b>X-Gal:</b>                             | <b>5-bromo-4-cloro-3-indolil-<math>\beta</math>-D-galactósido.</b> |
| <b>Y/F:</b>                               | <b>Cambio de Tirosina por Fenilalanina</b>                         |

# ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>TÍTULO</b>  |           |
| <b>AGRADECIMIENTO</b>  |           |
| <b>DEDICATORIA</b>   |           |
| <b>RESUMEN</b>   |           |
| <b>ABSTRACT</b>  |           |
| <b>I. INTRODUCCIÓN</b>                                       | <b>1</b>  |
| <b>II. ANTECEDENTES</b>                                      | <b>3</b>  |
| <b>2.1. GENERALIDADES</b>                                    | <b>3</b>  |
| <b>2.1.1. ETIOLOGÍA</b>                                      | <b>3</b>  |
| <b>2.1.2. CICLO BIOLÓGICO</b>                                | <b>4</b>  |
| <b>2.1.3. EPIDEMIOLOGÍA</b>                                  | <b>5</b>  |
| <b>2.1.4. SINTOMATOLOGÍA</b>                                 | <b>6</b>  |
| <b>2.1.4.1. Malaria Asintomática</b>                         | <b>7</b>  |
| <b>2.1.5. DIAGNÓSTICO</b>                                    | <b>8</b>  |
| <b>2.1.6. TRATAMIENTO</b>                                    | <b>9</b>  |
| <b>2.2. RECURRENCIA DE LA MALARIAPOR <i>P. vivax</i></b>     | <b>10</b> |
| <b>2.2.1. RELAPSO O REINFECCIÓN</b>                          | <b>10</b> |
| <b>2.2.1.1. Análisis Polimórfico del gen <i>pvmsp3-a</i></b> | <b>12</b> |
| <b>2.2.2. RESISTENCIA</b>                                    | <b>13</b> |
| <b>2.2.2.1. Análisis Polimórfico del gen <i>pvmdr1</i></b>   | <b>14</b> |
| <b>III. OBJETIVOS</b>  | <b>16</b> |
| <b>IV. HIPÓTESIS</b>   | <b>16</b> |
| <b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b>                               | <b>17</b> |
| <b>5.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO</b>                             | <b>17</b> |
| <b>5.2. ANÁLISIS DE DATOS</b>                                | <b>18</b> |
| <b>5.3. MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN</b>                         | <b>19</b> |
| <b>5.3.1. EXTRACCIÓN DE DNA</b>                              | <b>19</b> |
| <b>5.3.2. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE <i>Plasmodium</i></b>     | <b>19</b> |
| <b>5.3.2.1. Nested PCR</b>                                   | <b>19</b> |

|   |    |
|---|----|
| 5.3.2.1.1. Primera PCR                                    | 19 |
| 5.3.2.1.2. Segunda PCR                                    | 20 |
| 5.3.3. GENOTIPIFICACIÓN MOLECULAR DE <i>P. vivax</i>      | 20 |
| 5.3.3.1. Nested PCR                                       | 20 |
| 5.3.3.1.1. Primera PCR                                    | 21 |
| 5.3.3.1.2. Segunda PCR                                    | 21 |
| 5.3.3.2. Digestión enzimática                             | 21 |
| 5.3.4. ANÁLISIS DE RESISTENCIA DE <i>P. vivax</i>         | 22 |
| 5.3.4.1. PCR Convencional                                 | 22 |
| 5.3.4.2. Secuenciamiento                                  | 23 |
| 5.3.4.3. Número de copias                                 | 24 |
| 5.3.4.4. Clonamiento                                      | 25 |
| VI. RESULTADOS  | 28 |
| 6.1. DETECCIÓN DE LA MALARIA DURANTE LA VIGILANCIA ACTIVA | 28 |
| 6.2. VARIABILIDAD POLIMÓRFICA DEL GEN <i>pvmsp3-α</i>     | 30 |
| 6.3. PATRONES DE RECURRENCIA                              | 36 |
| 6.4. MECANISMOS DE RESISTENCIA                            | 39 |
| VII. DISCUSIÓN  | 47 |
| 7.1. DETECCIÓN DE LA MALARIA DURANTE LA VIGILANCIA ACTIVA | 47 |
| 7.2. VARIABILIDAD POLIMÓRFICA DEL GEN <i>pvmsp3-α</i>     | 48 |
| 7.3. PATRONES DE RECURRENCIA                              | 50 |
| 7.4. MECANISMOS DE RESISTENCIA                            | 52 |
| VIII. CONCLUSIONES  | 55 |
| IX. RECOMENDACIONES                                       | 56 |
| X. BIBLIOGRAFÍA   | 57 |
| XI. ANEXOS  | 67 |

## **DEDICATORIA**

A mis padres Saturnino Valencia y Juana Ayala, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, porque creyeron en mí y porque me sacaron adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada mi meta.

A mi esposa Miriam y a mi hijo Leonardo, quienes han sido mi inspiración y motivación para los esfuerzos que he hecho en mi vida para superarme en mi formación personal y quienes al final han soportado cada situación difícil que pasamos debido a esos esfuerzos. Dios los bendiga por eso.

A mis hermanos, Carlos, Nikita, John y Engels, a mis sobrinos Alexandra, Rodrigo e Italo por estar conmigo y apoyarme siempre, los quiero mucho. Y a todos aquellos que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis.

¡Gracias a ustedes!

## **AGRADECIMIENTO**

Al Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Universidad Peruana Cayetano Heredia por haberme dado cobijo y por todo lo que aprendí en el, así mismo, por haberme dado su voto de confianza y por todo el apoyo otorgado a mi persona.

Un agradecimiento especial al Dr. Robert Gilman, al Dr. Joe Vinetz, a la Dra. Manuela Verastegui y al Dr. Holger Mayta, por su invaluable apoyo y confianza para la realización de esta tesis. A mi asesora, la Dra. Maritza Calderón Sánchez por su paciencia, apoyo y confianza en mí como persona y en mi trabajo. Gracias por sus consejos personales y académicos. Gracias por escucharme.

A mis maestros de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, que ayudaron en mi formación profesional. A mis jurados Mag. Ruth Garcia de la Guarda, Mag. Débora Alvarado, Mag. Teresa Barreto, Dr. Abelardo Maturrano, gracias por todo su tiempo invertido en la revisión de esta tesis.

A mis amigos y colegas: Edith Málaga, Roxana Zamudio, Nancy Chile, Susan Espetia, Sonia Apaza, Leny Sánchez, Janeth Acosta, Juan Pacori, Jesus Pinto, Manuel Fasabi y Gary Malpartida, por todo lo que vivimos y por su influencia en mi vida. Gracias por infundirme sus ánimos y compartir conmigo sus conocimientos. También quiero agradecerles el haberme hecho participe de su trabajo. Gracias de corazón. A mis amigos, porque sin ellos no hubiera sido lo mismo. Gracias, eternamente gracias, a todos.

## RESUMEN

*Plasmodium vivax* agente etiológico de la malaria, exhibe una gran variabilidad genética durante episodios recurrentes de la enfermedad. Esta recurrencia es informada como de baja prevalencia asociada con la malaria asintomática. Así mismo los episodios recurrentes (reinfecciones o relapsos) a menudo pueden ser confundidos por resistencia a fármacos como la cloroquina. Por lo tanto el objetivo principal de este estudio fue relacionar los patrones de recurrencia y la resistencia con la variabilidad genética de *P. vivax*. En este estudio se evaluaron las muestras secuenciales de individuos provenientes de una región endémica del Perú (Mazán-Iquitos), diagnosticados previamente con malaria, por microscopía, durante seguimientos activos y sometidos a un régimen de tratamiento estándar con cloroquina. La genotipificación realizada en base al gen *pvmsp3- $\alpha$* , utilizando el Nested PCR y la digestión enzimática, permitió identificar una alta variabilidad genética de *P. vivax*, a partir de la cual, se identificaron los patrones de recurrencia, establecidos como relapsos, a partir de estadios latentes o hipnozoitos homólogos (con haplotipos idénticos) y reinfecciones (con haplotipos diferentes). Los rangos de tiempo permitieron una identificación más precisa, observándose mayores frecuencias de relapsos por hipnozoitos homólogos antes de los 90 días post-primera evaluación y mayores frecuencias de reinfecciones después de este periodo. Así mismo las recurrencias en el primer periodo de tiempo, por haplotipos diferentes, pueden deberse también a hipnozoitos heterólogos. Complementando el estudio, el análisis de secuenciamiento del gen *pvmdr1*, permitió identificar SNPs, codificantes de mutaciones no sinónimas, relacionadas con resistencia a cloroquina. Estos SNPs, a través del software *U-Melt* (análisis *in silico*), presentaron variaciones en las temperaturas de fusión. Finalmente los resultados de cuantificación relativa con qPCR Real Time no mostraron diferencias significativas en el número de copias del gen *pvmdr1*.

**Palabras clave:** Cloroquina, Genotipificación, Haplotipos, Hipnozoito, Malaria Asintomática, Recurrencia, Variabilidad.



## ABSTRACT

*Plasmodium vivax* etiologic agent of malaria has a large genetic variability during recurrent episodes of the disease. This recurrence is reported as low prevalence associated with asymptomatic malaria. Also recurrent episodes (reinfection or relapse) can often be mistaken for drug resistance as chloroquine. Therefore the main objective of this study was to correlate the patterns of recurrence and resistance to the genetic variability of *P. vivax*. In this study, we evaluated the sequential samples of individuals from an endemic region of Peru (Mazán-Iquitos), previously diagnosed with malaria microscopy during active follows and subjected to a standard treatment regimen with chloroquine. Genotyping based on the *pvmSP3-α* gene, using Nested PCR and enzymatic digestion, identified high genetic variability of *P. vivax*, from which were identified recurrence patterns established as relapse, from latent stages or homologous hypnozoites (with identical haplotypes) and reinfections (with different haplotypes). The time ranges allow more accurate identification, with higher frequency of relapses by homologous hypnozoites before 90 days post-first evaluation and higher frequencies of reinfection after this period. Also recurrences in the first period of time, for different haplotypes may also be due to heterologous hypnozoites. Complementing the study, the sequencing analysis of the gene *pvmDR1*, identified SNPs, encoding nonsynonymous mutations related to resistance to chloroquine. These SNPs, through U-Melt software (in silico analysis), showed variations in the melting temperatures. Finally the results of relative quantification with Real Time qPCR no showed significant differences in copy number of the *pvmDR1* gene.

**Keywords:** Chloroquine, Genotyping, Haplotypes, Hipnozoite, Recurrence, Asymptomatic Malaria, Variability.

## I. INTRODUCCIÓN

La malaria es una hemoparasitosis aguda, de evolución crónica y recurrente, producida por protozoarios intracelulares obligados del género *Plasmodium* y transmitida por mosquitos hembras del género *Anopheles*. Dentro de las principales especies de parásitos tenemos a *Plasmodium vivax*, el cual causa la malaria terciaria benigna y ocasiona entre 147 a 436 millones de infecciones clínicas/año. A diferencia de *Plasmodium falciparum*, que causa la malaria terciaria maligna, *P. vivax* está menos asociado con mortalidad aunque se relaciona con una considerable morbilidad (Hay *et al.*, 2004; Vargas *et al.*, 2003).

Esta enfermedad parasitaria es un problema de salud global, ampliamente distribuida en el mundo. Según la OMS, malaria es endémica en 108 países, siendo el continente africano el más afectado con el 60% de los casos. En Latinoamérica, Brasil es el país con la más alta prevalencia de malaria, seguido por Colombia y Perú (WHO, 2005). En nuestro país, *P. vivax* es la especie predominante, sin embargo, recientemente varios estudios muestran regiones endémicas con una baja tasa de prevalencia en la transmisión, lo cual está relacionado con el alto índice de formas asintomáticas de la enfermedad (Branch *et al.*, 2005).

Las infecciones asintomáticas son poco conocidas en estas regiones pero a través de los sistemas de vigilancia activa, se ha demostrado persistencia de la infección y constantes recurrencias de la parasitemia. Es de considerar además que esta forma de la enfermedad, donde se ubican los portadores asintomáticos, tiene un gran significado epidemiológico, pues aunque es invisible al ojo clínico, contribuyen a mantener, difundir y perpetuar la infección. (Koram, 1993).

*P. vivax* se caracteriza por ocasionar recurrencias, principalmente por: a) relapsos, debidos a estadios latentes del mismo parásito en el hígado, conocidos

como hipnozoitos; la parasitemia reaparece semanas después de la cura del episodio inicial, b) reinfecciones, por la picadura infectante de otro mosquito.

Estas recurrencias originan adaptación inmunológica e incremento de la inmunidad en los huéspedes humanos, evitando las complicaciones de la enfermedad, por lo tanto se relacionan con las manifestaciones subclínicas y asintomáticas (Loyola, 1991; Branch *et al.*, 2005). Estas características propias del huésped junto con la variabilidad genética de *P. vivax* son una limitante para el tratamiento oportuno y efectivo de la enfermedad.

Sumado a esto, la variabilidad genética es un factor que influye significativamente en el flujo de genes, como aquellos que confieren resistencia a fármacos. En *P. vivax* la resistencia es otra forma de recurrencia de la parasitemia (Baird *et al.*, 2004). Al respecto, actualmente en el Perú la recurrencia por resistencia está pobremente definida, entendiendo estos mecanismos solo desde el punto de vista de las variaciones en el estado inmune de los pacientes.

Las medidas establecidas para el control de la malaria tienen como necesidad primordial conocer las frecuencias reales de las reinfecciones, las mismas que son confundidas a menudo por los relapsos y el incremento de la resistencia a fármacos como la cloroquina. En regiones endémicas como el distrito de Mazán, al sur de Iquitos, en el departamento de Loreto, no existen datos reales sobre la malaria asintomática, se carece de información sobre la dinámica de las reinfecciones, relapsos, resistencia a drogas y variabilidad genética de *P. vivax*; teniendo como población más expuesta y en mayor riesgo a los individuos no inmunes, las mujeres embarazadas y los niños.

Por lo tanto, este estudio tiene como principal objetivo: Relacionar los patrones de recurrencia y la resistencia con la variabilidad genética de *P. vivax*, estableciendo técnicas que nos permitan determinar la reinfección, el relapso o la resistencia. De esta manera se planteó la interrogante sobre: ¿Cuál es la

frecuencia de estos patrones de infección, en individuos asintomáticos provenientes de una región endémica? y apoyados en herramientas de epidemiología molecular, como la genotipificación y secuenciamiento, es posible identificar estas características en *P. vivax*.

Para lograr estos objetivos se tomaron en cuenta la utilización de varias técnicas moleculares. Nested-PCR, utilizado para el diagnóstico, en base a la amplificación del gen que codifica el RNA ribosomal 18S (*SSUrRNA*). PCR-RFLP, para la genotipificación, en base al polimorfismo del gen *pvmsp3- $\alpha$*  que codifica la proteína de superficie del merozoito (MSP3). Secuenciamiento, para identificar SNPs en el gen *pvm $dr1$* , el cual es ortólogo al gen de resistencia *pfmdr1* de *P. falciparum*. Así mismo, el uso del software *U-melt* (análisis *in silico*), para establecer diferencias en las temperaturas de fusión de estos SNPs. Finalmente, clonamiento y la utilización de técnicas como el qPCR Real Time, para establecer el número de copias del gen de resistencia.

## **II. ANTECEDENTES**

### **2.1. GENERALIDADES**

#### **2.1.1. ETIOLOGÍA**

La malaria es una enfermedad parasitaria causada por protozoarios del género *Plasmodium*. Más de 120 especies han sido descritas en mamíferos, reptiles y aves; sin embargo clásicamente, solo 4 especies son las que causan infección en humanos, dentro de estos tenemos a *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*; aunque recientemente *P. knowlesi*, el cual tiene a los monos

macacos como hospederos naturales, ha sido propuesto como el quinto parásito causante de malaria en humanos. Estas 5 especies de *Plasmodium* difieren en morfología, ciclo de vida y presentación clínica (Singh *et al.*, 2004; White, 2008).

### 2.1.2. CICLO BIOLÓGICO

En el ciclo biológico de *Plasmodium* existen 2 huéspedes, uno definitivo (la hembra del mosquito *Anopheles*, donde el *Plasmodium* se reproduce sexualmente) y otro intermediario (el ser humano, donde se realiza la reproducción asexual del parásito) (Manguin *et al.*, 1995). El ciclo empieza con la picadura de un huésped infectado por el mosquito *Anopheles*, en el cual se inicia la fase sexual o esporogónica, con una duración de 8 a 16 días, donde los gametocitos ingeridos maduran a gametos, se fusionan y dan lugar al cigoto, este es el único estadio diploide en el ciclo de vida de *Plasmodium* (la meiosis ocurre a pocas horas de la formación del cigoto, permaneciendo el parásito en las formas haploides durante semanas o meses) (McKenzie *et al.*, 2001). El cigoto se introduce en el epitelio intestinal del insecto, donde se desarrollan miles de esporozoitos que migran a las glándulas salivales, a partir de donde serán inoculadas en el torrente sanguíneo de un nuevo hospedero, iniciándose la fase asexual o esquizogónica del parásito.

En la fase asexual se observan 2 estadios: 1) exoeritrocítico, los esporozoitos pasan de la circulación sanguínea a las células hepáticas, donde se forman esquizontes (esquizogénesis), dando lugar a la formación de merozoitos que al quedar libres inician esta fase nuevamente, con una duración de 6 a 8 días, este estadio termina cuando los merozoitos invaden los hematíes, 2) eritrocítico; los merozoitos en el interior de los hematíes forman el trofozoito joven, luego adulto, seguido del esquizonte, originándose nuevamente merozoitos que al romper el hematíe repiten el ciclo y dependiendo de la especie, luego de 2 ó 3 generaciones, algunos merozoitos desarrollan los gametocitos que son la forma infectante para el mosquito (Aramburu *et al.*, 1999; Hay *et al.*, 2004). Una característica

propia de *P. vivax* y *P. ovale* es que estos tienen una forma asexual latente, conocido como hipnozoito, el cual persiste en el hígado y causa relapsos semanas después de la eliminación de los estadios sanguíneos que causan la infección aguda (Hanf *et al.*, 2009).

### 2.1.3. EPIDEMIOLOGÍA

Según la Organización mundial de la salud (OMS), la malaria es considerada una de las enfermedades tropicales más importantes, siendo endémica en África sub-Sahariana, oeste de Asia, América, el Caribe, Nueva Guinea, Vanuatu, Islas Salomón, India y Pakistán, donde vive la mitad de la población mundial. A mediados del 2008 unos 3200 millones de personas vivían en zonas con riesgo de transmisión, en 109 países y territorios (WHO, 2008a). Se estima que anualmente ocurren entre 350 y 500 millones de casos clínicos y entre 1,5 a 2,7 millones de muertes, la mayoría causados por *P. falciparum* y *P. vivax* (WHO, UNICEF, 2005). Siendo el continente africano el más afectado con alrededor del 60% de estos casos y más de 80% de muertes (WHO, 2007).

Entre las 4 especies causantes de malaria, *P. falciparum* y *P. vivax* tienen la mayor incidencia, considerando a *P. falciparum* como la más peligrosa, por su letalidad, por la dispersión mundial de sus estirpes resistentes a las drogas anti-maláricas y por su predominio en África. *P. vivax* es el segundo parásito causante de malaria más prevalente en el mundo, predominantemente en Asia, América Central y Sudamérica (Ousmane *et al.*, 2005). Actualmente *P. vivax* ocasiona 70-80 millones de infecciones/año, que es un poco más de la mitad de la casuística global registrada fuera de África, con más del 50% de los casos registrados en Latinoamérica (WHO, 2009). La habilidad de *P. vivax* de completar su ciclo esporogónico a una temperatura mínima de 16°C, comparada con 21°C utilizado por *P. falciparum*, ha contribuido a la capacidad de establecerse en distintas regiones tropicales, subtropicales y templadas (Mendis *et al.*, 2001).

En América, el 38,4% de la población vive en regiones ecológicas propicias para la transmisión de malaria. En el año 2000, de los 1,14 millones de casos notificados, 53,6% se presentaron en Brasil, seguido por 9,45% en Colombia, 8,65% en Ecuador, 6,12% en Perú, 4,68% en Guatemala, 3,08% en Honduras, 2,76% en Bolivia, 2,61% en Venezuela, 2,11% en Guyana y 1,15% en Surinam. A partir del 2005, con el incremento de casos de malaria por *P. vivax* en la región amazónica, el Perú ocupa el tercer lugar después de Brasil y Colombia (**WHO, 2005**).

En el Perú la malaria es endémica y caracterizada por ser cíclica o estacional. El área de transmisión involucra el 75% del territorio nacional, distribuido en escenarios epidemiológicos como la cuenca amazónica, valles occidentales de la costa norte y valles interandinos hasta los 2300 m.s.n.m. (**Aramburu et al., 1999; DRE-SVE, 2007**). En nuestro país, *P. vivax* es el más importante parásito causante de malaria en términos de su morbilidad y a pesar de la amplia prevalencia, estudios concernientes a su biología y a las manifestaciones de la enfermedad son limitados, en parte, debido a que la mayor atención ha sido dirigida a *P. falciparum* por ser el causante de la malaria maligna (**Ayala et al., 2005; Volman et al., 2005**).

La mayor incidencia de malaria, en el Perú, se encuentra en el norte de la región amazónica, donde se ubica el departamento de Loreto, siendo el epicentro de esta enfermedad desde los años 1990. En el 2008, esta región registró el 55% de los casos notificados, seguido por los departamentos de Madre de Dios, Piura, Tumbes y Junín, que constituyen un segundo estrato en relación a la carga de enfermedad (**MINSA, 2009**). En el 2009, esta región también registró el brote de mayor magnitud con 25928 casos. En el 2011 a nivel nacional se notificó 23062 casos, 11779 procedieron de Loreto (51 % del total).

Actualmente DIRESA Loreto ha notificado hasta la semana epidemiológica (SE) 29 del 2012, un total de 14463 casos, de los cuales 85,8% son por *P. vivax* y 14,2 % por *P. falciparum*. La provincia de Maynas, una de las siete que conforman el departamento de Loreto, en el 2008 registró 30% de los casos del país. Esta

provincia, de gran extensión territorial, limita al norte con Colombia y al Oeste con Ecuador, presenta distritos como Fernando Lores, San Juan Bautista y Mazán que conforman un importante foco de malaria principalmente por *P. vivax*. Estas localidades se ubican próximas a la ciudad de Iquitos, donde la dinámica de transmisión guarda relación con los desplazamientos de la población (MINSA, 2008).

#### 2.1.4. SINTOMATOLOGÍA

La sintomatología de la malaria consiste en un cuadro clínico clásico de escalofríos, episodios febriles intensos y sudoración. Al terminar la sudoración el paciente entra en un período asintomático, hasta el próximo acceso febril. Los primeros síntomas son poco específicos y similares a los de una infección viral: dolor de cabeza, debilidad, fatiga, mialgias y artralgias. En casos severos se presentan coma, acidosis metabólica, anemia severa, hipoglucemia, falla renal, falla pulmonar y esplenomegalia. En este estado, aun con tratamiento, la letalidad puede llegar a ser de 15-20% y si no se trata, la malaria complicada es casi siempre fatal. Sin embargo todos los signos y síntomas varían en función a la especie de *Plasmodium*, la carga parasitaria y estado inmune del paciente (Mwangi *et al.*, 2005; WHO, 2006).

Todas las especies de *Plasmodium* tienen un componente hemolítico, por lo que cada vez que una generación de merozoitos destruye el glóbulo rojo se originan los síntomas. En el caso de *P. falciparum*, los parásitos se multiplican rápidamente y pueden infectar más del 30% de los eritrocitos, causando altos niveles de hemólisis e incremento las complicaciones de la enfermedad; este parásito invade células de todas las edades mientras que *P. vivax* y *P. ovale* prefieren células jóvenes y *P. malariae* busca células maduras (Carlton *et al.*, 2003). Las características únicas de *P. vivax* y *P. ovale* en la reactivación de los hipnozoitos, llevan a la reaparición de nuevos episodios o relapsos, en estos casos, los síntomas subclínicos como dolor de cabeza, dolor de espalda, náuseas y malestar general pueden ser muy leves o estar ausentes (OPS, 2006).



#### **2.1.4.1. Malaria Asintomática**

La malaria asintomática está relacionada con las constantes infecciones y los relapsos, que ocasionan incremento de la inmunidad adquirida, con la consecuente disminución en las complicaciones de la enfermedad. Frecuentemente en regiones endémicas, tras prolongados periodos de infección, las personas expuestas tienen un alto grado de inmunidad y la malaria clínica es poco frecuente, con lo cual se incrementa el número de portadores asintomáticos.

Además varios estudios en *P. vivax* han señalado que durante los relapsos, la respuesta inmune es más rápida y amplificada, seguida de elevaciones adicionales en los niveles de anticuerpos (Loyola, 1991; Branch *et al.*, 2005).

La malaria puede comportarse como una infección asintomática sólo puede detectarse mediante procedimientos de laboratorio), como una infección subclínica (que supera el umbral clínico, pero no lo hace de forma típica), como una infección sintomática o, incluso, como una infección hiperaguda fulminante, de rápida evolución que produce la muerte. Las formas subclínicas y asintomáticas, donde se ubican los portadores, tienen gran significado epidemiológico pues aunque son invisibles al ojo clínico, contribuyen a mantener, difundir y perpetuar la infección (Koram, 1993).

La frecuencia de malaria asintomática no es conocida en regiones de baja transmisión. En Perú, los estudios se han limitado a diseños transversales, como los efectuados en las comunidades al sur de Iquitos, donde, a partir de 998 individuos, se encontraron 13 con *P. falciparum* y 30 con *P. vivax*, todos detectados por microscopía, de éstos, sólo 8 y 19 respectivamente, reportaron solo fiebre. (Alves *et al.*, 2002; Roshanravan *et al.*, 2003; Branch *et al.*, 2005).

#### **2.1.5. DIAGNÓSTICO**

El diagnóstico oportuno y preciso es crítico para el manejo efectivo de la malaria. Las implicaciones del diagnóstico guardan relación con la diferente

morfología de las especies maláricas, la esquizogonia eritrocítica, la endemidad, los niveles de transmisión, la densidad parasitaria, la inmunidad, los signos y síntomas clínicos, la resistencia a drogas, la malaria recurrente y la parasitemia persistente, todo un conjunto complejo de elementos que influyen en la interpretación del diagnóstico (**Tangpukdee et al., 2009**). La presentación clínica de la malaria es variable y poco específica, por lo tanto es necesario incorporar técnicas de laboratorio para su diagnóstico (**Perkins y Bell, 2008**).

La microscopía convencional, utilizando el examen de gota gruesa o frotis sanguíneo, se considera el método idóneo para el diagnóstico y control de la malaria, aún cuando puede presentar menor sensibilidad que las técnicas moleculares, particularmente ante parasitemias bajas e infecciones mixtas (**Gillet et al., 2009; Tangpukdee et al., 2009**). Su umbral de detección se ubica entre 4 y 20 parásitos/ $\mu$ l (**Wongsrichanalai et al., 2007**), aunque en condiciones de campo, un umbral entre 50 y 100 parásitos/ $\mu$ l se considera más realista, con un número recomendado de campos a ser leídos entre 100 y 400 (**WHO, 1991**).

Por otra parte diferentes estudios han demostrado que los métodos moleculares detectan 8 veces más infecciones, por *Plasmodium* spp., que la microscopía, representando las infecciones mixtas, hasta un tercio de ellas. Las herramientas de diagnóstico molecular han modificado la interpretación de la epidemiología malárica, al revelar grandes reservorios de infecciones asintomáticas (**Steenkeste et al., 2009**). Además son consideradas muy importantes por su utilidad para identificar especies cuando las densidades parasitarias son muy bajas, en las infecciones mixtas o cuando las muestras se han deteriorado. Esta es una técnica altamente específica y sensible, con un umbral de detección entre 1 y 10 parásitos/ $\mu$ l. Las técnicas moleculares también permiten detectar parásitos resistentes a drogas y analizar el polimorfismo genético en estudios de relapsos (**Johnston et al., 2006; Kain et al., 1993**).

### 2.1.6. TRATAMIENTO

La pauta antimalárica, para *P. vivax*, contempla el tratamiento de cura radical recomendado por la OMS: Combinación de Cloroquina (CQ) a razón de 25 mg/kilo de peso corporal, distribuidos en 3 días y Primaquina (PQ) a razón de 0,25 mg/kilo de peso corporal, por día, durante 14 días. La primera actúa como esquizonticida sanguíneo, elimina trofozoitos y esquizontes que son las formas asexuales responsables de las manifestaciones clínicas y la segunda actúa como esquizonticida tisular, elimina los parásitos en desarrollo o latentes (hipnozoitos) en el hígado, para prevenir los relapsos (WHO, 2006). En el caso de relapsos, al igual que en el episodio inicial, las pautas para el tratamiento son las mismas. En caso de un segundo o tercer relapso deberá prescribirse la cloroquina en la misma dosis y la primaquina al doble, dosificando a 0,5 mg/kg por día por 14 días ó 0,25 mg/kg por día durante 28 días (Álvarez *et al.*, 2006).

### 2.2. RECURRENCIA DE LA MALARIA POR *P. vivax*

La reinfección, los relapsos y la resistencia a fármacos son el origen de las recurrencias. Cuando una parasitemia reaparece después del tratamiento, puede tratarse de: a) un relapso, por reactivación de estadios latentes en el hígado, conocidos como hipnozoitos, b) una reinfección, por la picadura infectante de otro mosquito, que en zonas endémicas es constante o c) una resistencia, originada por estadios asexuales sanguíneos que sobrevivieron a la terapia y permanecieron a niveles subpatentes (Baird *et al.*, 2004; Orjuela *et al.*, 2009a).

Diversos ensayos clínicos con drogas antimaláricas estiman alarmantes rangos de recurrencia de *P. vivax*, los cuales pueden llegar de 26% a 40 % en 180 días de seguimiento post-tratamiento. Algunos estudios en regiones de la amazonía rural reportan recurrencias de la parasitemia por haplotipos idénticos de *P. vivax* (consistentes con reactivación de hipnozoitos homólogos) y por haplotipos

relacionados pero diferentes, sugiriendo la necesidad de caracterizar un número mayor de muestras con infección primaria y recurrente para determinar exactamente la asociación genotípica (**Mallika et al., 2007; Baird et al., 2008; Orjuela et al., 2009b**).

### **2.2.1. RELAPSO O REINFECCIÓN**

El manejo y control de *P. vivax* es complicado por su habilidad de causar relapsos y por las continuas reinfecciones. Los relapsos presentan variaciones notables de acuerdo a las diferentes regiones geográficas y climáticas, así las cepas originarias de regiones tropicales están caracterizadas por una infección primaria temprana, seguido por un corto periodo latente, de 5 a 10 semanas, antes de la aparición de frecuentes relapsos durante el siguiente año. En contraste cepas de regiones templadas están caracterizadas por un periodo variable antes de la infección primaria, seguido por un largo periodo latente, de 5 a 10 meses, antes del comienzo de los relapsos. Claros ejemplos son los estudios realizados en Guyana Francesa, donde se mostraron picos de relapsos en los primeros 3 meses después del episodio inicial, posterior a este periodo la mayoría de episodios fueron principalmente debidos a reinfecciones. Estas observaciones mostraron un patrón de cepa tropical, con un corto periodo latente para el inicio de los relapsos. (**Alyson et al., 1996; Hanf et al., 2009**).

En varios estudios registran frecuencias para los relapsos que varían desde 11% en la India hasta 51% en Afganistán, con valores intermedios de 30% en Indonesia (**WHO, 2006**). En Colombia, un estudio realizado en el año 2004 mostró que el tiempo en que se presentan la recurrencias (relapsos), en pacientes sometidos a diferentes esquemas de tratamiento, fluctúan entre 53 a 129 días después del episodio inicial (**Álvarez et al., 2006**).

Diferenciar relapso y reinfección en regiones endémicas resulta complicado, la mayoría de estudios usan técnicas moleculares como la genotipificación para

hacer una distinción entre los tipos de recurrencias, diferenciando los relapsos (con el mismo genotipo como en la infección inicial) de las reinfecciones (con un genotipo diferente) (Orjuela *et al.*, 2009b), cabe señalar además que los relapsos pueden originarse tanto desde la reactivación del mismo clon del parásito, encontrado en la infección inicial (hipnozoito homólogo), como de otro clon genéticamente diferente (hipnozoito heterólogo). Otros estudios estiman el relapso usando rangos de tiempo según el tipo de cepa o basado en la frecuencia de casos de *P. vivax* durante la estación de no transmisión. De forma más precisa, algunos proponen una simple clasificación para la fácil diferenciación entre relapsos y reinfecciones, se plantean rangos de tiempo a escala individual, identificando infecciones antes de 90 días post-primer episodio, con una alta probabilidad que el ataque secundario sea un relapso y después de los 90 días es más probable que el ataque secundario sea por una reinfección (Chen *et al.*, 2007; Veron *et al.*, 2009).

#### **2.2.1.1. Análisis Polimórfico del gen *pvmSP3-α***

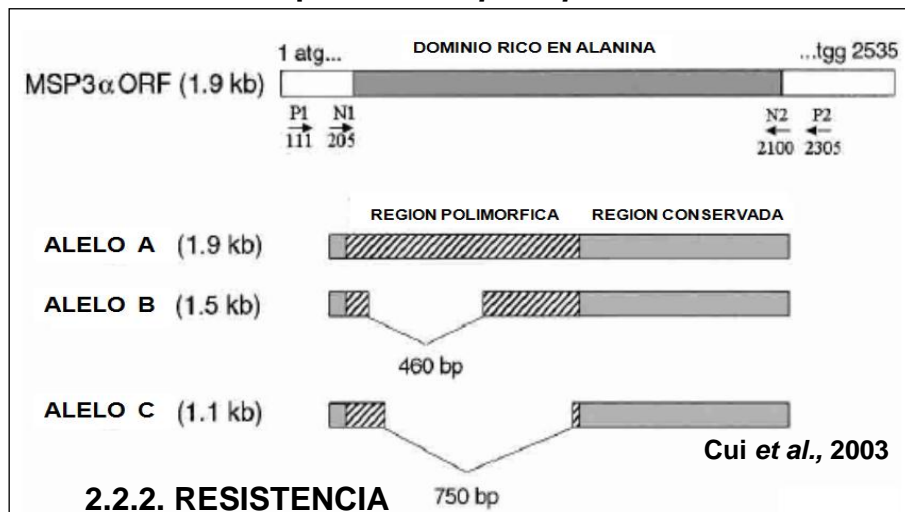
La epidemiología molecular contribuye a diferenciar entre relapsos y reinfecciones, mediante la utilización de técnicas moleculares. El marcador *pvmSP3-α*, que codifica para la proteína de superficie del merozoito (MSP3-α), ha sido extensamente estudiado (Cui *et al.*, 2003). Este gen de copia única comúnmente utilizado para la genotipificación de *P. vivax*, codifica una región altamente polimórfica con un dominio central rico en Alanina que contiene una región interna compuesta por motivos repetitivos de longitud variable (PlasmoDB gene ID: PVX\_097720). La proteína codificada por este gen, tiene un peso molecular entre 148 a 150 KD, se encuentra en el estadio eritrocítico del ciclo de vida del parásito y es considerada como un potencial blanco de vacunas. (Cui *et al.*, 2003; Mascorro *et al.*, 2005; Imwong *et al.*, 2005).

En países como Irán, Papúa Nueva Guinea y Colombia el polimorfismo del gen *pvmSP3-α* ha sido ampliamente estudiado, mediante la utilización de técnicas como el Nested-PCR y digestión enzimática o RFLP, con enzimas como *Alu I* y

*Hha I* (Zakeri *et al.*, 2006; Cole-Tobian *et al.*, 2005; Cristiano *et al.*, 2008). A su vez en Venezuela y Tailandia se han llevado a cabo técnicas de secuenciamiento génico, para determinar más extensamente el polimorfismo de este gen (Ord *et al.*, 2005; Cui *et al.*, 2003).

Tres alelos principales han sido reportados después de realizar el Nested-PCR, los cuales son caracterizados como alelo A = 1800 a 1900 pb, B = 1500 pb y C = 1100 a 1200 pb. La diversidad puede ser mayor dentro de estos alelos, si se utiliza la digestión enzimática combinando las enzimas *Hha I* y *Alu I*. La digestión nos permite obtener patrones de corte enzimático, a partir del producto de amplificación, que pueden ser compilados y usados para la genotipificación de *P. vivax*. Las técnicas tanto de Nested-PCR como de RFLP permiten identificar no solo haplotipos monoclonales sino también policlonales y las frecuencias de estos haplotipos permiten definir el nivel de la diversidad poblacional (PLD) y la complejidad de la infección (COI) (Bruce *et al.* 1999, Ord *et al.*, 2005, Sutton *et al.*, 2009).

### Gen polimórfico *pvmsp3-α* de *P. vivax*



La recurrencia, debida a la incompleta eliminación de estadios eritrocíticos del parásito, ocasionada por el inadecuado tratamiento terapéutico, también puede ser producida por mecanismos de resistencia. Aunque la resistencia podría ser común después de un tratamiento inadecuado, también es necesaria la presencia

de parásitos resistentes, con variaciones genéticas en su genoma (Cogswell *et al.*, 1992). En el control de la malaria por *P. vivax*, las medidas aplicadas son confundidas a menudo por factores como el surgimiento de resistencia a drogas, principalmente a cloroquina. El primer caso de resistencia de *P. vivax* a cloroquina fue reportado en 1989 desde Papúa Nueva Guinea, donde la monoterapia con este fármaco es ahora virtualmente inefectiva. Más recientemente casos esporádicos han sido reportados desde Myanmar, Sudamérica, Vietnam, y Turquía (Hay *et al.*, 2004; Price *et al.*, 2007).

Reportes desde Sudamérica también sugieren la presencia de casos aislados de *P. vivax* resistente a cloroquina, principalmente en regiones endémicas como la ciudad de Manaus, en Brasil, donde en el 2000 se identificaron casos de infección con *P. vivax* resistente al tratamiento con cloroquina (Alecrim, 2000). En Perú a partir de 1998, debido al peligro de propagación de la resistencia a cloroquina, el Ministerio de Salud empezó una serie de ensayos de eficacia terapéutica de este fármaco (Garg *et al.*, 1995; Dua *et al.*, 1996). Sin embargo a pesar de los reportes clínicos, la prevalencia global de resistencia por *P. vivax* permanece pobremente definida, principalmente debido a las variaciones de las condiciones inmunológicas de cada paciente, por las continuas reinfecciones y por los relapsos (Nomura *et al.*, 2001; Tjitra *et al.*, 2002; Ratcliff *et al.*, 2007).

### 2.2.2.1. Análisis Polimórfico del gen *pvmdr1*

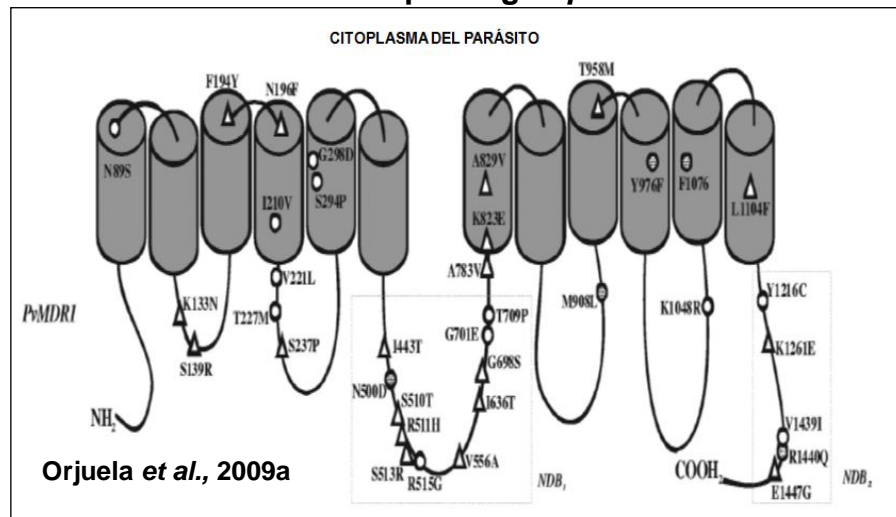
Estudios sobre el perfil de susceptibilidad a drogas han permitido identificar proteínas transportadoras de membrana, como el MDR1, asociadas con resistencia a cloroquina (CQR) principalmente en *P. falciparum*. Así mismo el secuenciamiento permitió identificar proteínas ortólogas en *P. vivax*, codificadas por el gen *pvmdr1* (Baird *et al.*, 2004; Babiker *et al.*, 2001).

El gen *pvmdr1* está caracterizado por un único ORF de 4392 bp que codifica una proteína de 1464 aa. Para determinar la resistencia a drogas fueron tomadas en consideración 2 regiones de este gen: La primera abarca la posición

homóloga a los sitios polimórficos 86 y 184, la segunda abarca la posición homóloga a los sitios polimórficos 1034 y 1042 de *P. falciparum*, que están relacionadas con el fenotipo CQR.

El análisis de secuenciamiento permitió identificar polimorfismo de nucleótidos únicos o SNPs en los codones 976 y 1076, localizados en los segmentos hidrofóbicos X y XI de la proteína MDR. SNPs en estos codones originan mutaciones no sinónimas como el cambio de aminoácidos Y/F y F/L, respectivamente. Estos SNPs fueron asociados con CQR tanto *in vitro* como *in vivo* y fueron reportados esporádicamente en pacientes provenientes de las regiones amazónicas tanto del Perú como de Brasil (Sattabongkot *et al.*, 2004; Fidock *et al.*, 2000; Brega *et al.*, 2005; Suwanarusk *et al.*, 2007).

### Proteína TRM codificada por el gen *pvmdr1* de *P. vivax*



El análisis completo de la secuencia nucleotídica del gen *pvmdr1* demostró que contiene 24 SNPs y una única secuencia microsatélite conservada. Notablemente 17 (73%) de los SNPs fueron no-sinónimos; sin embargo a pesar de esta alta frecuencia de SNPs, ninguno fue encontrado en los motivos conservados ABC. El motivo ABC es una secuencia aminoacídica corta, presente en el sitio de fijación a nucleótidos (NBD), el cual junto con los motivos Walker, es responsable de la hidrólisis de ATP (Brega *et al.*, 2005). El SNP en el codón Y976F fue propuesto



como un marcador temprano de CQR y en estudios de susceptibilidad *in vitro* fue encontrado en un 96.1% (123/128) de aislados provenientes de Indonesia comparados a un 25% (17/69) de aislados provenientes de Tailandia. En Indonesia, la media geométrica IC50 de susceptibilidad a cloroquina en aislados con mutación Y976F fue de 283 nM, significativamente mayor que en los aislados con el genotipo *wild type* con 44,5 nM (Suwanarusk *et al.*, 2007; Orjuela *et al.*, 2009a).

Por otro lado la CQR también está relacionada con la variación en el número de copias de genes que codifican proteínas de resistencia como el MDR1. Estudios efectuados en cepas provenientes de África principalmente en *P. falciparum* se basan en técnicas de qPCR Real Time para determinar estas variaciones (Ferreira *et al.*, 2006). Así mismo los plásmidos clonados (fragmentos de *pvmdr1* y *pvald1*) utilizados como calibradores permitieron determinar el número de copias en distintos aislados provenientes de Indonesia y Tailandia (Suwanarusk *et al.*, 2007).

### III. OBJETIVOS

#### Objetivo general

- Relacionar los patrones de recurrencia y la resistencia con la variabilidad genética de *Plasmodium vivax*, en individuos con infección asintomática provenientes de Mazán, región endémica del Perú.

#### Objetivos específicos

- Detectar infecciones recurrentes por *P. vivax*, en individuos asintomáticos.
- Identificar la variabilidad genética de *P. vivax*, en base al gen *pvmSP3-α*, en individuos con infección recurrente.
- Identificar los patrones de recurrencia asociados a la variabilidad genética de *P. vivax*.
- Identificar mutaciones no sinónimas e incremento en el número de copias del gen *pvmDR1*, relacionados con resistencia de *P. vivax* a la cloroquina.

### IV. HIPÓTESIS

- Los patrones de recurrencia y la resistencia de *P. vivax*, en individuos con infección asintomática, están relacionados con la variabilidad genética del parásito, identificada por el polimorfismo del gen *pvmSP3-α* y por la presencia de mutaciones no sinónimas e incremento en el número de copias del gen *pvmDR1*.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

El presente estudio se realizó con muestras colectadas, entre Junio del 2006 y Noviembre del 2008, en el distrito de Mazán ubicado en la parte Nororiental del Perú a 50 km de la ciudad de Iquitos, capital del departamento de Loreto. Presenta un clima tropical, cálido, húmedo y lluvioso, con una temperatura promedio de 28°C y es considerada una zona de alto riesgo para la transmisión de *P. vivax*. (Sawyer, 1993).

La población total de individuos, supuestamente sanos, captados para este estudio fue de 496. La normalización estadística de datos permitió obtener una muestra significativa de 222 individuos. Para ello se tomaron en cuenta niveles de confianza al 95% ( $Z_{\alpha_2} = 1.962$ ), con proporción esperada del 50% ( $p=0.5$ ;  $q=1-p$ ) y precisión estadística en 5% ( $d=0.05$ ). A partir de este grupo se obtuvieron 444 muestras, colectadas mediante el sistema de vigilancia activa y evaluadas dentro del contexto de un estudio de eficacia de cloroquina *in vivo* para el tratamiento de la malaria por *P. vivax*.

Los criterios de inclusión fueron: Individuos comprendidos entre 0 a 75 años de edad, firma de consentimiento informado, residentes en la zona endémica, con 2 muestras secuenciales, previamente diagnosticados por microscopía y evaluados durante un año de seguimiento activo. Criterios de exclusión fueron: Individuos con tratamiento antimalárico previo al diagnóstico y con manifestaciones clínicas o subclínicas de la enfermedad.

Todas las muestras colectadas en tubos de EDTA y en un volumen de 5 ml de sangre total (punción venosa) fueron trasladadas en cajas provistas con hielo seco y enviadas al área de Biología Molecular en el Laboratorio de Investigación y

Desarrollo de la Universidad Peruana Cayetano Heredia en Lima–Perú. Este estudio forma parte del proyecto: “*Human reservoirs of Plasmodium vivax transmission in the Peruvian Amazon*”, aprobado por el comité de ética de la universidad en mención (código SIDISI: 50457). En colaboración con la Universidad Johns Hopkins en USA, el Instituto de Medicina Tropical “Alexander Von Humbolt”, la Asociación Benéfica “PRISMA” y el Ministerio de Salud a través de la Dirección Regional de Salud de Loreto.

## 5.2. ANÁLISIS DE DATOS

La variabilidad genética de *P. vivax* fue evaluada mediante la determinación del nivel de la diversidad poblacional (PLD), definido como la variación genética de un gen, en un loci antigénico, variable o neutral. Una medida del PLD es la heterocigosidad esperada ( $H_e = 1/(1 - N) (1 - \sum p_i^2)$ ) (Sutton *et al.*, 2009), con  $p$  igual a la frecuencia del alelo y  $N$  igual al número de alelos detectados, los valores del  $H_e$  oscilan entre 0 a 1, considerando una alta variabilidad genética cuando los valores son cercanos a la unidad. La complejidad de la infección (COI) es usada también para evaluar la variabilidad genética, identificando el mínimo número de alelos presentes en un loci polimórfico de copia única. Un  $COI > 1$  puede ser determinado por la observación de múltiples alelos dentro de una única muestra.

Para medir la significancia de las frecuencias de haplotipos encontrados se utilizó la prueba de Fisher (F). En esta prueba el valor de la razón estadística (F prueba) fue comparada con el valor de la razón tabular (F tabla). Considerando un nivel de significancia del 95% ( $1-\alpha = 0,95$ ) y valorando las frecuencias observadas como similares (F prueba < F tabla) o variables (F prueba > F tabla). Para el análisis de relación se utilizó el Chi-cuadrado ( $X^2$ ). Considerando una relación significativa con una probabilidad del 95%, cuando  $p < 0,05$  (Tabla  $X^2$ ) y altamente significativa con una probabilidad del 99%, cuando  $p < 0,01$  (Tabla  $X^2$ ) con grados de libertad mayores a cero ( $GL \geq 1$ ).

### 5.3. MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN

El diseño de la investigación planteada es de tipo **Experimental**.

#### 5.3.1. EXTRACCIÓN DE DNA

Se realizó la extracción de DNA a partir de las muestras de sangre en EDTA, mediante el protocolo del Kit comercial *QIAamp DNA Blood* (*Qiagen Sciences*, Maryland-USA). El volumen utilizado fue de 200 µl, a partir de lo cual se obtuvo una concentración entre 20 a 50 ng de DNA, el cual fue conservado inmediatamente a una temperatura de -20°C, posteriormente utilizado tanto para el diagnóstico como para la genotipificación molecular.

#### 5.3.2. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Plasmodium*

##### 5.3.2.1. Nested PCR

La detección de las especies de *Plasmodium* se realizó mediante el Nested-PCR, el cual consta de 2 PCR consecutivos, realizados con la finalidad de aumentar tanto la especificidad como la sensibilidad del análisis. Los oligonucleótidos y condiciones de reacción y amplificación fueron adaptadas de Roshanravan *et al.*, 2003.

**5.3.2.1.1. Primera PCR:** Se amplificó un segmento del gen que codifica el RNA ribosomal 18S (*SSUrRNA*) de 1200 pb, específico del género *Plasmodium*. Los oligonucleótidos fueron: Plagen1= 5'-CTTGTTGTTGCCTTAAACTTC-3' y Plagen2= 5'-TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG-3'.

La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 15 µl conteniendo: buffer 1X (10 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 0,25 µM de cada oligonucleótido, 0,032 U/µl Taq DNA polimerasa (*Promega*) y 50 ng de DNA. Las condiciones fueron: 95°C por 3 min.; 19 ciclos cada uno de 94°C por 30 seg., 58°C por 30 seg., 72°C por 1 min.30seg. y 1 ciclo de extensión final de 72°C por 7 min.

**5.3.2.1.2. Segunda PCR:** Se amplificó una región interna específica para *P. vivax* y para *P. falciparum*. Los oligonucleótidos fueron: Para *P. vivax*: Viv1= 5'-CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC-3' y Viv2= 5'-ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA-3', que amplificaron 120 pb. Para *P. falciparum*: Fal1= 5'-TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAATATATT-3' y Fal2= 5'-ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC-3', que amplificaron 205 pb.

La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 15 µl conteniendo: buffer 1X (10 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 µM de cada oligonucleótido, 0,032 U/µl Taq DNA polimerasa (*Promega*) y 1 µl de DNA obtenido de la primera amplificación. Las condiciones fueron: 95°C por 2 min, 34 ciclos cada uno de 94°C por 30 seg., 60°C por 1 min.30seg., 72°C por 1 min. 30 seg., y finalmente 1 ciclo de extensión de 72°C por 7 min.

Las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador PT-100 MJ *Research*. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 2% (*Invitrogen, Life technologies*) conteniendo 0,05 mg de bromuro de etidio (*Sigma Chemical CO.*) y visualizados bajo iluminación UV. Los oligonucleótidos seleccionados fueron evaluados con: BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), CLUSTAL X (*Gibson et al., 1994*), PRIMER PREMIER (<http://www.premierbiosoft.com/primer design/index.html>).

### 5.3.3. GENOTIPIFICACIÓN MOLECULAR DE *P. vivax*

#### 5.3.3.1. Nested PCR

Para la amplificación de la región polimórfica del gen *pvmSP3-α* se realizó un Nested PCR. Los oligonucleótidos y condiciones de reacción y amplificación fueron adaptadas de Bruce *et al.*, 1999 y Cui *et al.*, 2003.

**5.3.3.1.1. Primera PCR:** Los oligonucleótidos utilizados fueron: P1V1= 5'-CAGCAGACACCATTTAAGG-3' y P2V1= 5'-CCGTTTGTTGATTAGTTGC-3'. La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 15 µl, conteniendo: buffer 1X (10 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,15 mM de dNTPs, 0,15 µM de cada oligonucleótido, 0,013 U/µl. Taq DNA polimerasa (*Promega*) y 50 ng de DNA. Las condiciones fueron: 94°C por 3 min., 34 ciclos cada uno de 94°C por 30 seg., 56°C por 30 seg., 68°C por 2 min. 30seg. y 1 ciclo de extensión final de 72°C por 4 min.

**5.3.3.1.2. Segunda PCR:** Los oligonucleótidos utilizados fueron: N1V1= 5'-GACCAGTGTGATACCATTAACC-3' y N2V1= 5'-ATACTGGTTCTTCGTCTTCAGG-3'. Estas secuencias amplificaron fragmentos de 1900 pb y 1500 pb, correspondientes a los alelos A y B respectivamente. Las reacciones de amplificación fueron similares a las usadas para la primera PCR, agregando 1 µl de DNA a cada reacción, obtenido de la primera amplificación. Las condiciones fueron de: 94°C por 3 min., 29 ciclos cada uno de 94°C por 30 seg., 57°C por 30 seg., 68°C por 2 min. 30seg. y 1 ciclo de extensión final de 68°C por 4 min.

Las reacciones de PCR y el análisis de los productos de PCR en geles de agarosa al 1% se realizaron tal como se describe en la sección 5.3.2.1.2. Los tamaños de los fragmentos fueron determinados usando un marcador de peso

molecular de 1 Kb (*Invitrogen, Life technologies*). Todas las muestras fueron analizadas por duplicado para confirmar la reproducibilidad de los resultados.

### 5.3.3.2. Digestión enzimática

Para determinar el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), que permite establecer los diferentes haplotipos, se utilizaron 2 enzimas de digestión *Alu I* y *Hha I* (20000 U/ml. *BioLabs Inc. UK*) usadas para la genotipificación de *P. vivax* (*Kosek et al., 2012*). Cien nanogramos de DNA amplificado, proveniente de la segunda PCR, fueron digeridos con: 1X NEBuffer 4 (50 mM de acetato de potasio, 20 mM Tris-acetato, 10 mM Acetato de magnesio, 1 mM ditiotritol pH 7,9), 0,5U de *Alu I* y 0,5U de *Hha I* en un volumen final de 16 µl. La incubación de la reacción se realizó a 37°C por 3 horas, posteriormente las enzimas fueron inactivadas a 65°C por 10 min.

Los fragmentos de DNA obtenidos de la digestión enzimática fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 2%, tal como se describe en la sección 5.3.2.1.2. Los tamaños de los fragmentos fueron determinados usando un marcador de peso molecular de 100 bp (*Invitrogen, Life technologies*). Los patrones enzimáticos fueron establecidos en base al número y al tamaño de los fragmentos producidos con cada enzima, designados como haplotipos PA para *Alu I* y PH para *Hha I*. Las infecciones policlonales o mixtas fueron identificadas usando 2 criterios: Por el Nested PCR, con la presencia de 2 o más secuencias alélicas del producto no digerido (Alelos A ó B) y por el RFLP comparando la suma de los tamaños de los fragmentos del producto digerido con el tamaño del producto no digerido.



### 5.3.4. ANÁLISIS DE RESISTENCIA DE *P. vivax*

#### 5.3.4.1. PCR Convencional

Para identificar la resistencia de *P. vivax* se realizó inicialmente una PCR convencional, para amplificar el gen *pvmdr1*. Posteriormente los productos de amplificación previamente purificados fueron secuenciados. Los oligonucleótidos y condiciones de reacción y amplificación fueron adaptadas de Brega *et al.*, 2005.

Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes: MdrF800= 5'-ATAGTCATGCCCCAGGATTG-3' y MdrR800= 5'-ACGTTTGGTCTGGACAAGTATC-3', cuyo producto de amplificación fue de 800 pb. La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 20 µl, conteniendo: buffer 1X (10 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,25 mM de dNTPs, 0,5 µM de cada oligonucleótido, 0,03 U/µl. Taq DNA polimerasa (*Promega*) y 50 ng de DNA. Las condiciones fueron: 94°C por 2 min., 34 ciclos cada uno de 94°C por 1 min., 62°C por 1 min., 72°C por 1 min. y 1 ciclo de extensión final de 72°C por 5 min.

#### 5.3.4.2. Secuenciamiento

Los productos de amplificación del gen *pvmdr1* (sección 5.3.4.1.) fueron enviados a los laboratorios de la corporación MacroGen en Maryland-USA para su secuenciamiento, mediante el secuenciador BigDye Terminator 3.1 (Applied Biosystems). Se envió a secuenciar la región que comprende los SNPs en los codones Y976F y F1076L del gen *pvmdr1*, usando los mismos oligonucleótidos mencionados en la sección anterior.

Estas secuencias fueron comparadas con las secuencias del gen *pvmdr1* de la cepa Sal1 de *P. vivax* (GenBank Acc. No. AY618622) sensible a cloroquina y proveniente del Salvador, usada como cepa de referencia en este estudio. Las

secuencias obtenidas fueron alineadas y analizadas usando el programa ClustalW2 disponible libremente en la página web: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>, además para investigar la relación filogenética entre estas secuencias provenientes de diferentes muestras, se utilizó el programa Clustal C. La presencia de SNPs en estos codones relacionados con resistencia a cloroquina fue confirmado, identificando los cambios de aminoácidos en la secuencia proteica a través de un proceso de transducción in silico, mediante el software *Translate a DNA Sequence* disponible libremente en la página web: <http://arbl.cvmbs.colostate.edu/molkit/translate/>.

Adicionalmente las secuencias del gen *pvm-dr1*, conteniendo los SNPs en los codones Y976F y F1076L, fueron analizados in silico para determinar las temperaturas de fusión en alta resolución o HRM mediante el software *U-Melt* disponible libremente en la página web: <http://www.dna.utah.edu/umelt/um.php>, el cual proporciona datos para una fácil discriminación entre los genotipos *wild-type* y los genotipos mutantes.

#### 5.3.4.3. Número de copias

Para determinar el número de copias del gen *pvm-dr1*, se utilizó el método de cuantificación relativa mediante qPCR en tiempo real con fluoróforo *SYBR Green I*, mediante el sistema de  $\Delta\Delta C_t$  comparativo en el equipo *Step One Plus Real Time* 7700. En este sistema de cuantificación el gen de copia única, Aldolasa (*pvald1*) codificado por *P. vivax* (GenBank Acc. No. AF247063), es usado como gen endógeno (normalizador) para estimar el número de copias del gen *pvm-dr1* (problema) Las secuencias, así como los oligonucleótidos y las condiciones de reacción y amplificación fueron adaptadas de Suwanarusk *et al.*, 2007.

Los oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen *pvm-dr1* fueron los siguientes: mdr1F= 5'-CTGATACAAGTGAGGAAGAACTACG-3' y mdr1R= 5'-GTCCACCTGACAACCTTAGATGC-3', cuyo producto de amplificación fue de 151

pb y para amplificar el gen *pvald1* se utilizaron: AldF= 5'-GACAGTGCCACCATCCTTACC-3' y AldR= 5'-CCTTCTCAACATTCTCCTTCTTTCC-3', cuyo producto de amplificación fue de 191 pb.

La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 20 µl, conteniendo: Master Mix *SYBR Green 1X* (*Invitrogen, Life technologies*) y 0,1 µM de cada oligonucleótido. Las condiciones fueron: 95°C por 10 min., seguido de 40 ciclos cada uno de 95°C por 30 seg., 60°C por 1 min., y 72°C por 30 seg., los cambios de fluorescencia se midieron en el canal F1 del instrumento *StepOne Plus Real Time 7700*, en el final de la fase de extensión de cada ciclo. Los ensayos fueron optimizados con una concentración de DNA a partir de 50 ng/µl.

El sistema de cuantificación relativa en tiempo real, requiere la utilización de fragmentos clonados del gen *pvald1* y del gen *pvmdr1* de *P. vivax*. Estos fragmentos fueron utilizados como calibradores y controles de amplificación en cada experimento. El software para la cuantificación relativa se basa en la utilización del sistema de ciclo del *threshold* (Ct) comparativo dada por la fórmula:  $N = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ , donde  $\Delta\Delta Ct = (Ct_{pvald1} - Ct_{pvmdr1}) - (Ct_{pvald1cal} - Ct_{pvmdr1cal})$ . El Ct *pvald1* y Ct *pvmdr1* son valores de Ct para el gen *pvald1* y *pvmdr1* respectivamente, mientras que el Ctcal es una diferencia promedio entre Ct *pvald1* y Ct *pvmdr1* obtenida de los calibradores conteniendo una única copia de los fragmentos clonados.

#### 5.3.4.4. Clonamiento

Los calibradores (fragmentos de los genes *pvald1* de 191 pb y *pvmdr1* de 151 pb) fueron clonados, siguiendo los siguientes procedimientos:

**PCR Convencional y ligación:** Para el PCR la reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 20  $\mu$ l, conteniendo: buffer 1X (10 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl), 2,5 mM de  $MgCl_2$ , 0,25 mM de dNTPs, 0,075  $\mu$ M de cada oligonucleótido, 0,03 U/ $\mu$ l. Taq DNA polimerasa (*Promega*) y 50 ng de DNA. Las condiciones de reacción fueron: 94°C por 1 min., 34 ciclos cada uno de 94°C por 1 min., 54°C por 1 min., 72°C por 1 min. y 1 ciclo de extensión final de 72°C por 5 min. Los productos de PCR fueron purificados utilizando el kit QIAquick PCR Purification a través de la columna de Spin DNAquick (*Qiagen*).

El proceso de ligación de los fragmentos de los genes *pvald1* y *pvmdr1* (insertos), amplificados previamente, se realizó con el vector pGEM-T easy (*Promega*). Este vector es lineal y presenta bases de Timina (T) en los extremos 3' terminal, que se unen por complementariedad con los extremos poliA 5' terminal de los productos de amplificación; esta característica facilita la ligación y evita la recirculización del vector. La ligación se realizó en un volumen final de 10  $\mu$ l, conteniendo: buffer 1X (60 mM Tris-HCl pH 7,8, 20 mM  $MgCl_2$ , 2mM ATP), pGEM-T easy 5 ng/ $\mu$ l, T4 DNA ligasa 10U y una relación de inserto con vector de 3:1.

**Preparación de células competentes y transformación:** La preparación de células competentes se inicio con el cultivo de *Escherichia coli* (*E. coli* - cepa NovaBlue) en agar/LB (*Difco*) e incubación a 37°C durante toda la noche. Posteriormente colonias de *E.coli* fueron inoculadas en medio LB (Tryptona 1%, extracto de levadura 0,5% (*Difco*) y NaCl 0,5% (*Merck*)) e incubadas a 37°C con agitación a 250 rpm, durante 2 horas, hasta que el OD (600 nm) sea de 0,35 a 0,45.

Las células con valores óptimos de OD fueron centrifugadas a 4000 rpm por 10 min. a 4°C, el sobrenadante fue descartado y el pellet resuspendido con 20 ml de 0,1 M  $CaCl_2$  y 15% glicerol frio. Después de 15 minutos de incubación en hielo, se realizó una segunda centrifugación a 3000 rpm por 10 min. a 4°C, el

sobrenadante fue descartado y el pellet resuspendido con 1 ml de 0,1 M CaCl<sub>2</sub> y 15% glicerol frío, finalmente las células competentes fueron conservadas a -70°C en alícuotas de 50 µl.

El proceso de transformación se realizó mediante shock térmico, con 2 µl del inserto ligado al vector pGEM-T easy y 50 µl de células competentes previamente descongeladas a 4°C. Las células fueron incubadas en hielo a 4°C por 30 min. e inmediatamente llevadas a baño maría a 42°C por 50 seg. Posteriormente volúmenes de 50 µl, 100 µl y 150 µl de células transformadas fueron sembradas en agar/LB suplementado con 100 µg/ml de carbenicilina, 80 µl/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-gal) y 0,5 mM de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG); esparcidas con una densidad menor a 10<sup>4</sup> células por placa de cultivo e incubadas a 37°C durante toda la noche.

**Análisis de recombinantes:** La clonación y transformación fue confirmada por el crecimiento de *E. coli* en agar/LB suplementado con antibiótico de selección (carbenicilina 100 mg/ml) y para diferenciar entre células transformadas que adquirieron o no el inserto, el medio de crecimiento fue enriquecido con X-gal (sustrato cromogénico) e IPTG. De esta manera las células que captaron los plásmidos con el operón lac intacto, una vez inducidas por IPTG, expresaron activamente β-galactosidasa, que al hidrolizar a X-gal coloreo las colonias de azul.

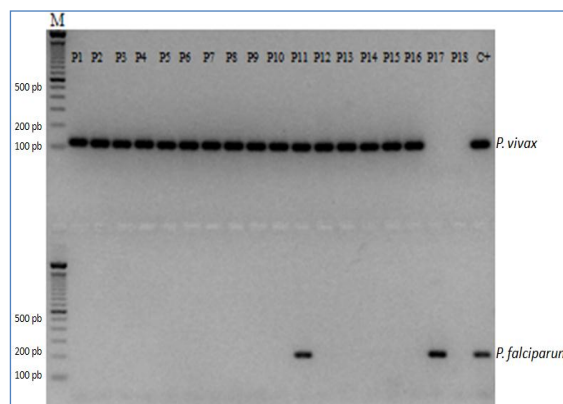
Por otro lado las células que captaron los plásmidos con el operón lac recombinante, con el inserto del fragmento de interés, sufrieron con la inserción la inactivación del gen lacZ (uno de los genes que codifica la β-galactosidasa) y por tanto, no expresaron β-galactosidasa ni degradaron X-gal, dejando las colonias de color blanco. Dichas colonias blancas también fueron utilizadas para PCR, con los oligonucleótidos específicos para los insertos, descrito anteriormente en la sección 5.3.4.4.

**Purificación del plásmido calibrador:** Colonias de células transformadas que adquirieron el inserto fueron inoculadas en 10 ml de medio LB + Carbenicilina e incubadas a 37°C con agitación a 250 rpm, durante toda la noche. Posteriormente las células en medio LB fueron centrifugadas a 3000 rpm por 15 min. a 4°C, el sobrenadante fue descartado y el pellet resuspendido y purificado mediante kit de purificación de plásmidos *EasyPrep (Invitrogen, Life technologies)*, siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA plasmídico fue diluido hasta obtener una concentración equivalente a una copia/μl del fragmento clonado (*pvald1* ó *pvmdr1*), siendo esta de 3,5 atogramos/μl ( $3,513 \times 10^{-18}$  gramos).

## VI. RESULTADOS

### 6.1. DETECCIÓN DE LA MALARIA DURANTE LA VIGILANCIA ACTIVA

La detección de la malaria por el sistema de vigilancia activa, se realizó a través del Nested PCR (Fig. 1). Durante la primera evaluación se detectaron: 86% (191/222) de casos con infección por *P. vivax*; 0,9% (2/222) de casos con infección por *P. falciparum*, 9,5% (21/222) de casos con infección mixta y 3,6% (8/222) fueron negativos. Durante la segunda evaluación, considerando los casos con infección primaria por *P. vivax*, se detectaron recurrencias de la infección por este parásito en 81% (180/222) de los casos, por *P. falciparum* 1,8% (4/222), por infecciones mixtas 2,7% (6/222) y no hubo recurrencias 0,45% (1/222). También durante la segunda evaluación se detectaron infecciones por *P. vivax*, en 0,9% (2/222), 7,2% (16/222) y 2,7% (6/222) de casos, que durante la primera evaluación fueron detectados como infecciones por *P. falciparum*, mixtas y negativas respectivamente. Además se observó que 2,3% (5/222) de casos permanecieron como infecciones mixtas y que 0,45% (1/222) de infecciones por *P. falciparum* así como 0,45% (1/222) de infecciones mixtas detectados en la segunda evaluación, anteriormente fueron negativos (Tabla 1 y Fig. 2).



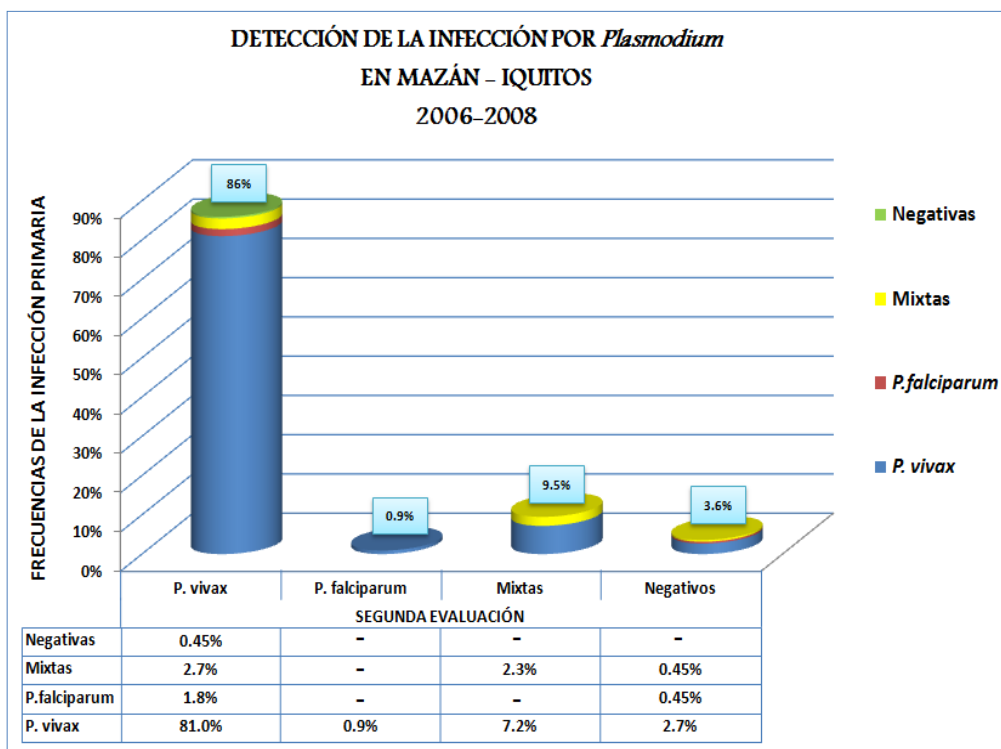
**Fig. 1. Diagnóstico de la malaria por Nested PCR.** Detección de *P. vivax*, *P. falciparum* e infecciones mixtas durante la vigilancia activa. M: marcador 100 pb., P1-P18: pacientes diagnosticados (P11 con infección mixta, P17 con *P. falciparum* y P18 negativo), C+: control positivo.

El diagnóstico por Nested PCR mostró una mayor sensibilidad en comparación con la microscopía, realizada previamente, a través del método de gota gruesa (GG). En la primera evaluación, la sensibilidad del Nested PCR fue de un 99% frente a un 91,6% de la microscopía, en este grupo, solo 24 muestras fueron diagnosticadas como negativas por microscopía, de las cuales 18 fueron positivas y 6 negativas por Nested PCR, así mismo solo 2 muestras que fueron positivas por microscopía fueron negativas por Nested PCR, las cuales tuvieron un conteo menor a 40 parásitos/μl en 50 campos observados y una densidad < 100 parásitos/μl. En la segunda evaluación, la sensibilidad del Nested PCR fue del 100% frente a 87,8% de la microscopía, en este grupo, de 28 muestras negativas por microscopía, 27 fueron positivas y solo 1 negativa por Nested PCR (Tabla 2).

**Tabla 1. Detección de la malaria mediante Nested PCR.** Rango de frecuencias de *P. vivax*, *P. falciparum*, infecciones mixtas y casos negativos, durante la vigilancia activa.

| PRIMERA EVALUACIÓN   |                    | SEGUNDA EVALUACIÓN |                      |                  |                  |
|----------------------|--------------------|--------------------|----------------------|------------------|------------------|
| INFECCIÓN            |                    | <i>P. vivax</i>    | <i>P. falciparum</i> | Mixtas           | Negativos        |
| <i>P. vivax</i>      | 86,0%<br>(191/222) | 81%<br>(180/222)   | 1,8%<br>(4/222)      | 2,7%<br>(6/222)  | 0,45%<br>(1/222) |
| <i>P. falciparum</i> | 0,9%<br>(2/222)    | 0,9%<br>(2/222)    | 0%<br>-----          | 0%<br>-----      | 0%<br>-----      |
| Mixtas               | 9,5%<br>(21/222)   | 7,2%<br>(16/222)   | 0%<br>-----          | 2,3%<br>(5/222)  | 0%<br>-----      |
| Negativas            | 3,6%<br>(8/222)    | 2,7%<br>(6/222)    | 0,45%<br>(1/222)     | 0,45%<br>(1/222) | 0%<br>-----      |





**Fig. 2. Detección de la malaria mediante Nested PCR.** Frecuencias de infección primaria y recurrente, en individuos asintomáticos provenientes de Mazán-Iquitos.

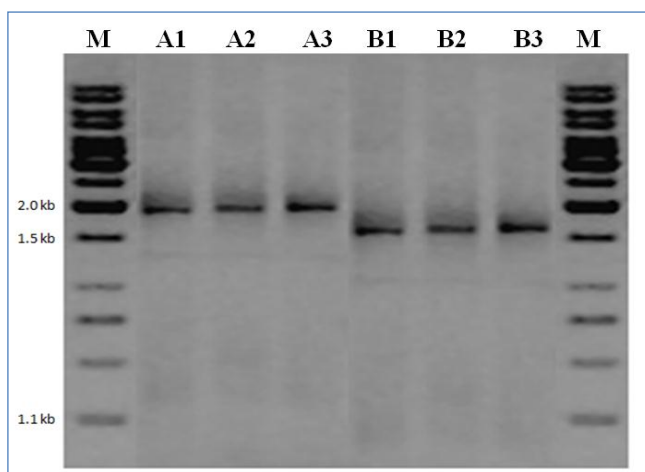
**Tabla 2. Comparación de la detección de la malaria por microscopía y Nested PCR.** Número de casos positivos y negativos diagnosticados en individuos supuestamente sanos.

| CONDICIÓN DIAGNÓSTICA | PRIMERA EVALUACIÓN (n=222) | SEGUNDA EVALUACIÓN (n=222) |
|-----------------------|----------------------------|----------------------------|
| G (+) y PCR (+)       | 196                        | 194                        |
| GG (+) y PCR (-)      | 2                          | 0                          |
| GG (-) y PCR (+)      | 18                         | 27                         |
| GG (-) y PCR (-)      | 6                          | 1                          |

\*Sensibilidad Nested PCR: 99% y 100%; Microscopía (GG): 91.6% y 87.8%

## 6.2. VARIABILIDAD POLIMÓRFICA DEL GEN *pvmsp3-α*

La genotipificación de *P. vivax* se realizó en todos los individuos con infección recurrente por este parásito, correspondientes al 81% (180/222) de la población muestreada. Mediante el Nested PCR se identificaron 2 secuencias alélicas diferentes, el A (1,900 pb) y el B (1500 pb) (Fig. 3). En la primera evaluación 95,5% (172/180) de las infecciones, presentaron el alelo A, mientras que 4,5% (8/180) presentaron el alelo B. En la segunda evaluación 92,2% (166/180) de las infecciones, presentaron nuevamente el alelo A y 1,7% (3/180) nuevamente el alelo B. Además 2,8% (5/180) con el alelo A y 3,3% (6/180) con el alelo B fueron identificados en la primera evaluación como alelos B y A respectivamente (Tabla 3).



**Fig. 3. Genotipificación de *P. vivax* mediante Nested PCR (*pvmsp3-α*).** M: Marcador de 1 kb., A1-A3: muestras con el alelo A, B1-B3: muestras con el alelo B.

Mediante la digestión enzimática utilizando *Hha I*, en el alelo A, se identificaron 9 haplotipos monoclonales (PH1 a PH9) y 3 haplotipos policlonales (PH11 a PH13), con esta misma enzima, en el alelo B, se identificó 1 haplotipo monoclonal (PH10) (Fig. 4A). Todos los haplotipos presentaron fragmentos polimórficos entre 200-1000 bp. (Tabla 4). Utilizando *Alu I*, en el alelo A, se identificaron 6 haplotipos monoclonales (PA1-PA6) y 1 haplotipo policlonal (PA8), con esta misma enzima, en el alelo B, se identificó 1 haplotipo monoclonal (PA7)

(Fig. 4B). En este caso todos los haplotipos presentaron fragmentos polimórficos entre 150-550 bp. (Tabla 4).

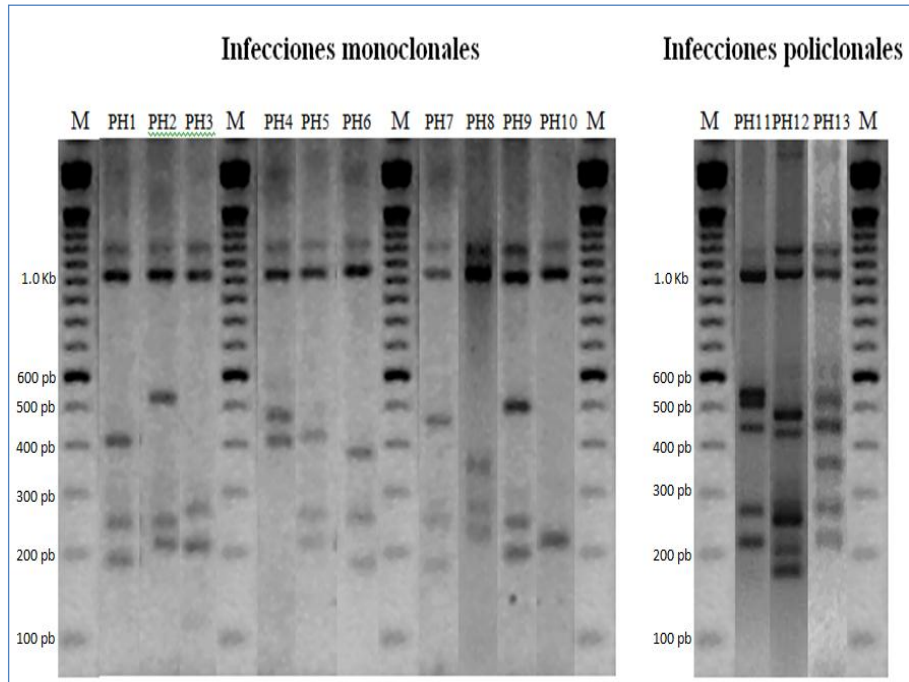
**Tabla 3. Genotipificación de *P. vivax* en individuos con infección recurrente.** Rango de frecuencias del alelo A (1900 pb) y alelo B (1500 pb).

| PRIMERA EVALUACIÓN |                    | SEGUNDA EVALUACIÓN               |                               |
|--------------------|--------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| ALELOS             |                    | A                                | B                             |
| <b>A</b>           | 95,5%<br>(172/180) | <b>92,2%</b><br><b>(166/180)</b> | 3,3%<br>(6/180)               |
| <b>B</b>           | 4,5%<br>(8/180)    | 2,8%<br>(5/180)                  | <b>1,7%</b><br><b>(3/180)</b> |

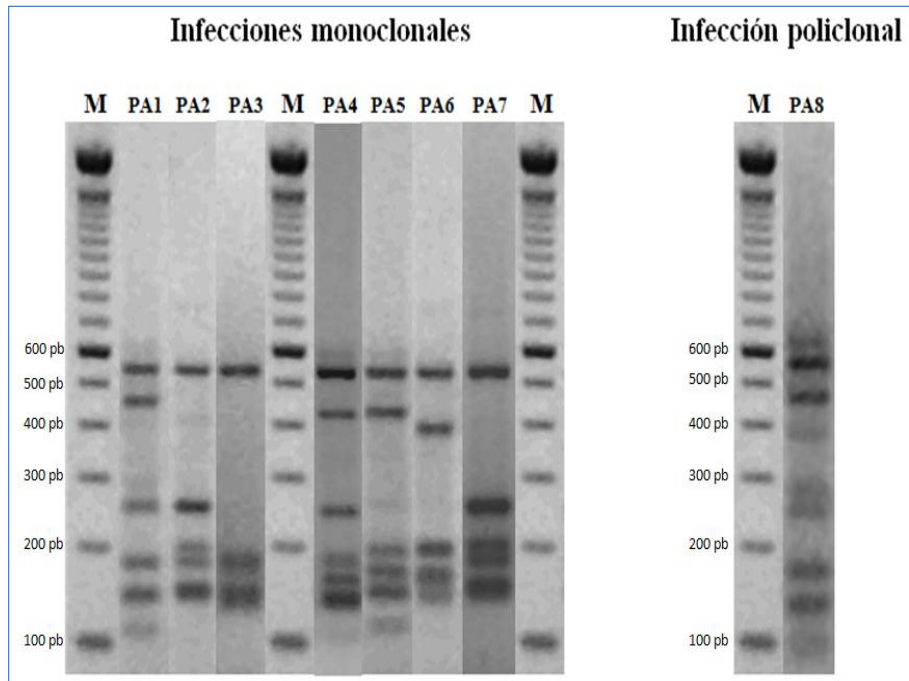
Con la combinación de ambas enzimas se logró identificar una mayor variabilidad genética, con 14 haplotipos monoclonales (PAH1-PAH14) y 7 haplotipos policlonales (PHA15-PHA21) (Tabla 4). Analizando la recurrencia de estos haplotipos, se identificó a PHA13, PHA2 y PHA6 como los más recurrentes con 5,5%, 7,2% y 12,2%, respectivamente. Por otra parte los haplotipos PHA8, PHA10, PHA17 y PHA 19 no fueron identificados en la primera evaluación, por lo tanto no se pudo evaluar las recurrencias en estos haplotipos. Del mismo modo, fue posible identificar la frecuencia de haplotipos no recurrentes y policlonales (presentes como haplotipos diferentes en la segunda evaluación) (Fig. 5).

En el análisis estadístico, el 5,6% (10/180) de los individuos en la primera evaluación y 3,9% (7/180) en la segunda evaluación, presentaron un COI>1, correspondientes a infecciones por haplotipos policlonales o infecciones mixtas. Los valores PLD fueron  $H_e=0,88$  y  $0,87$  en ambos periodos de evaluación, demostrando una alta variabilidad genética. Además la prueba F ( $\alpha=0,05$ ;  $F_p < F_t$ ), indicó que no existe diferencias reales entre las frecuencias de haplotipos identificados, en ambos periodos de evaluación (Tabla 5).

### A. PATRONES ENZIMÁTICOS CON *Hha I*



### B. PATRONES ENZIMÁTICOS CON *Alu I*

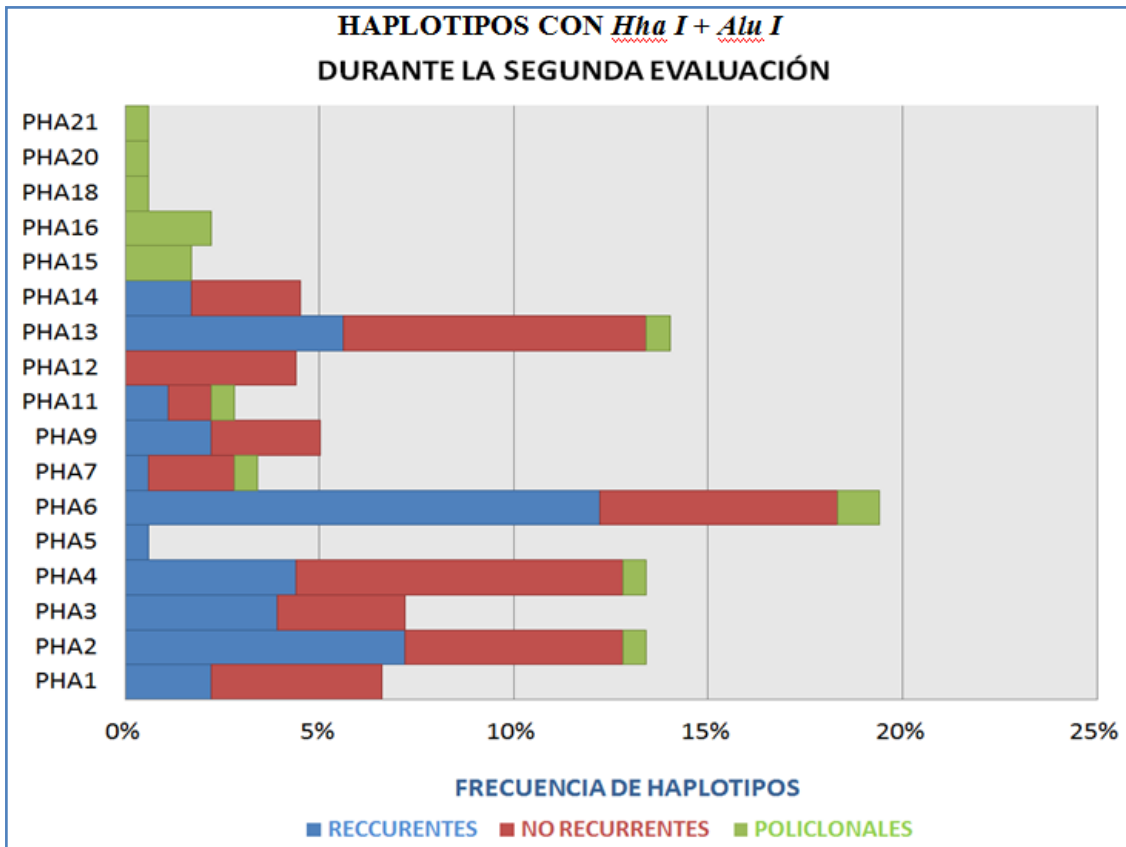


**Fig. 4. Genotipificación de *P. vivax* mediante digestión enzimática.** M: Marcador de 100 pb. A. Haplotipos identificados con la enzima *Hha I*, B. Haplotipos identificados con la enzima *Alu I*.

**Tabla 4. Tamaño de los fragmentos de digestión enzimática con *Hha I* y *Alu I*.**

| <i>Hha I</i> | TAMAÑO FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN |     |     |     |     | <i>Alu I</i> | TAMAÑO FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN |     |     |     |     | COMBINACIÓN |        |        |       |
|--------------|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|--------------|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-------------|--------|--------|-------|
| .PH1         | 1000                             | 400 | 240 | 190 |     | .PA1         | 550                              | 460 | 250 | 180 | 150 | PH1PA2      | .PHA1  |        |       |
| .PH2         | 1000                             | 510 | 240 | 210 |     | .PA2         | 550                              | 250 | 200 | 180 | 150 | PH2PA1      | .PHA2  |        |       |
| .PH3         | 1000                             | 260 | 210 |     |     | .PA3         | 550                              | 180 | 140 |     |     | PH3PA6      | .PHA3  |        |       |
| .PH4         | 1000                             | 490 | 400 |     |     | .PA4         | 550                              | 410 | 250 | 180 | 160 | 140         | PH4PA2 | .PHA4  |       |
| .PH5         | 1000                             | 400 | 260 | 210 |     | .PA5         | 550                              | 410 | 200 | 170 | 150 | PH4PA3      | .PHA5  |        |       |
| .PH6         | 1000                             | 390 | 260 | 190 |     | .PA6         | 550                              | 400 | 200 | 170 | 150 | PH5PA2      | .PHA6  |        |       |
| .PH7         | 1000                             | 490 | 260 | 190 |     | .PA7         | 550                              | 250 | 200 | 180 | 150 | PH6PA3      | .PHA7  |        |       |
| .PH8         | 1000                             | 350 | 290 | 230 |     | *PA8         | 550                              | 460 | 390 | 290 | 250 | 170         | 150    | PH6PA7 | .PHA8 |
| .PH9         | 1000                             | 500 | 260 | 200 |     |              |                                  |     |     |     |     | PH7PA3      | .PHA9  |        |       |
| *PH10        | 1000                             | 340 |     |     |     |              |                                  |     |     |     |     | PH8PA3      | .PHA10 |        |       |
| *PH11        | 1000                             | 510 | 500 | 450 | 270 | 210          |                                  |     |     |     |     | PH8PA7      | .PHA11 |        |       |
| *PH12        | 1000                             | 490 | 440 | 260 | 200 | 180          |                                  |     |     |     |     | PH9PA4      | .PHA12 |        |       |
| *PH13        | 1000                             | 510 | 450 | 360 | 270 | 210          |                                  |     |     |     |     | PH9PA5      | .PHA13 |        |       |
|              |                                  |     |     |     |     |              |                                  |     |     |     |     | PH10.PA7    | .PHA14 |        |       |
|              |                                  |     |     |     |     |              |                                  |     |     |     |     | PH11PA2     | *PHA15 |        |       |
|              |                                  |     |     |     |     |              |                                  |     |     |     |     | PH11PA4     | *PHA16 |        |       |
|              |                                  |     |     |     |     |              |                                  |     |     |     |     | PH11PA8     | *PHA17 |        |       |
|              |                                  |     |     |     |     |              |                                  |     |     |     |     | PH11PA6     | *PHA18 |        |       |
|              |                                  |     |     |     |     |              |                                  |     |     |     |     | PH11PA7     | *PHA19 |        |       |
|              |                                  |     |     |     |     |              |                                  |     |     |     |     | PH12PA1     | *PHA20 |        |       |
|              |                                  |     |     |     |     |              |                                  |     |     |     |     | PH13PA7     | *PHA21 |        |       |

(.) Patrón en el alelo A, (:) Patrón en el alelo B, (\*) Patrones policlonales



|                  | PHA1 | PHA2 | PHA3 | PHA4 | PHA5 | PHA6  | PHA7 | PHA9 | PHA11 | PHA12 | PHA13 | PHA14 | PHA15 | PHA16 | PHA18 | PHA20 | PHA21 |
|------------------|------|------|------|------|------|-------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| ■ RECURRENTES    | 2.2% | 7.2% | 3.9% | 4.4% | 0.6% | 12.2% | 0.6% | 2.2% | 1.1%  |       | 5.6%  | 1.7%  |       |       |       |       |       |
| ■ NO RECURRENTES | 4.4% | 5.6% | 3.3% | 8.4% |      | 6.1%  | 2.2% | 2.8% | 1.1%  | 4.4%  | 7.8%  | 2.8%  |       |       |       |       |       |
| ■ POLICLONALES   |      | 0.6% |      | 0.6% |      | 1.1%  | 0.6% |      | 0.6%  |       | 0.6%  |       | 1.7%  | 2.2%  | 0.6%  | 0.6%  | 0.6%  |

**Fig. 5. Análisis de la recurrencia de haplotipos durante la segunda evaluación.** Haplotipos identificados con la combinación de *Hha I* + *Alu I*. Prueba F ( $\alpha=0,05$ ): no existe diferencias reales entre las frecuencias de haplotipos identificados en la primera y segunda evaluación; F prueba < F tabla.

**Tabla 5. Evaluación de la variabilidad genética de *pvmsp3-α***, COI: Complejidad de la infección, PLD: Nivel de la Diversidad poblacional, He: Heterocigosidad esperada, F: Prueba de Fisher.

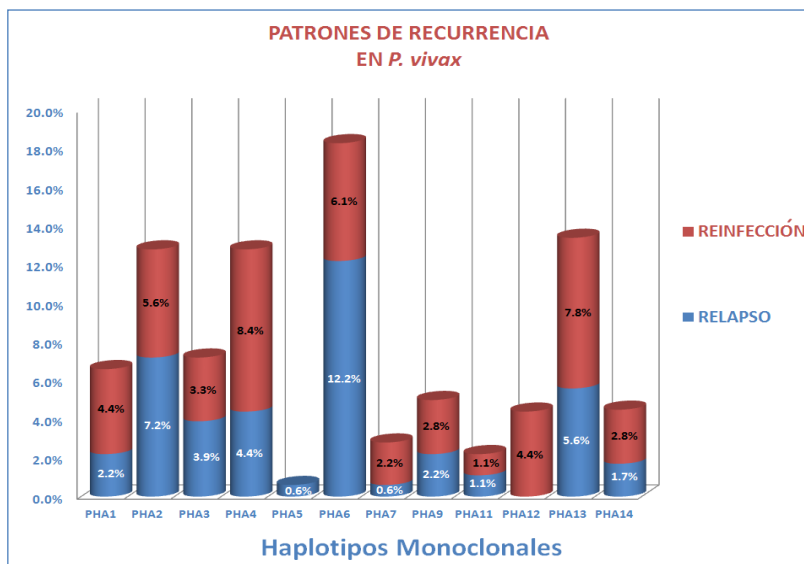
| <b>EVALUACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE <i>pvmsp3-α</i></b> |                                     |                           |
|--|-------------------------------------|---------------------------|
|  | <b>PRIMERA EVALUACIÓN</b>           | <b>SEGUNDA EVALUACIÓN</b> |
| <b>ENZIMAS</b>   | <i>Hha I + Alu I</i>                | <i>Hha I + Alu I</i>      |
| <b>N° HAPLOTIPOS</b>   | 21                                  | 21                        |
| <b>COI&gt;1</b>  | 5,6%                                | 3,9%                      |
| <b>PLD (He)</b>  | 0,88                                | 0,87                      |
| <b>Fisher (F)</b>  | Fp < Ft ; α=0,05<br>(0,0023 < 4,22) |                           |

### 6.3. PATRONES DE RECURRENCIA

La variabilidad genética permitió identificar recurrencias por haplotipos monoclonales idénticos (relapsos) a la infección primaria en 41,7% (75/180) y por haplotipos monoclonales diferentes (reinfecciones) en 48,9% (88/180) de los casos. Las infecciones con el haplotipo PHA6 tuvieron la mayor frecuencia de recurrencias por el mismo haplotipo con 12,2% y las infecciones con PHA5 y PHA7 tuvieron las menores recurrencias por el mismo haplotipo, ambos con 0,6% (1/180), además la infección con PHA5 presentó recurrencia solo por el mismo haplotipo. Por otra parte las infecciones con el haplotipo PHA4 tuvieron la mayor frecuencia de recurrencias, pero por haplotipos diferentes, con 8,4% (15/180) y las infecciones con PHA 11 tuvieron recurrencias de 1,1% (2/180) tanto por el mismo haplotipo como por haplotipos diferentes. También las infecciones con el haplotipo PHA12 presentaron únicamente recurrencias por haplotipos diferentes (Tabla 6 y Fig. 6).

**Tabla 6. Patrones de recurrencia en individuos infectados con *P. vivax*.** Frecuencia de recurrencias por haplotipos monoclonales idénticos (relapsos) y diferentes (reinfecciones).

| PATRONES DE RECURRENCIA |                |               |
|-------------------------|----------------|---------------|
| HAPLOTIPOS MONOCLONALES | RELAPSOS       | REINFECCIONES |
| PHA1                    | 2,2% (4/180)   | 4,4% (8/180)  |
| PHA2                    | 7,2% (13/180)  | 5,6% (10/180) |
| PHA3                    | 3,9% (7/180)   | 3,3% (6/180)  |
| PHA4                    | 4,4% (8/180)   | 8,4% (15/180) |
| PHA5                    | 0,6% (1/180)   | -----         |
| PHA6                    | 12,2% (22/180) | 6,1% (11/180) |
| PHA7                    | 0,6% (1/180)   | 2,2% (4/180)  |
| PHA9                    | 2,2% (4/180)   | 2,8% (5/180)  |
| PHA11                   | 1,1% (2/180)   | 1,1% (2/180)  |
| PHA12                   | -----          | 4,4% (8/180)  |
| PHA13                   | 5,6% (10/180)  | 7,8% (14/180) |
| PHA14                   | 1,7% (3/180)   | 2,8% (5/180)  |
| <b>TOTAL</b>            | <b>41,7%</b>   | <b>48,9%</b>  |



**Fig. 6. Frecuencia de haplotipos monoclonales causantes de reinfección y relapso**

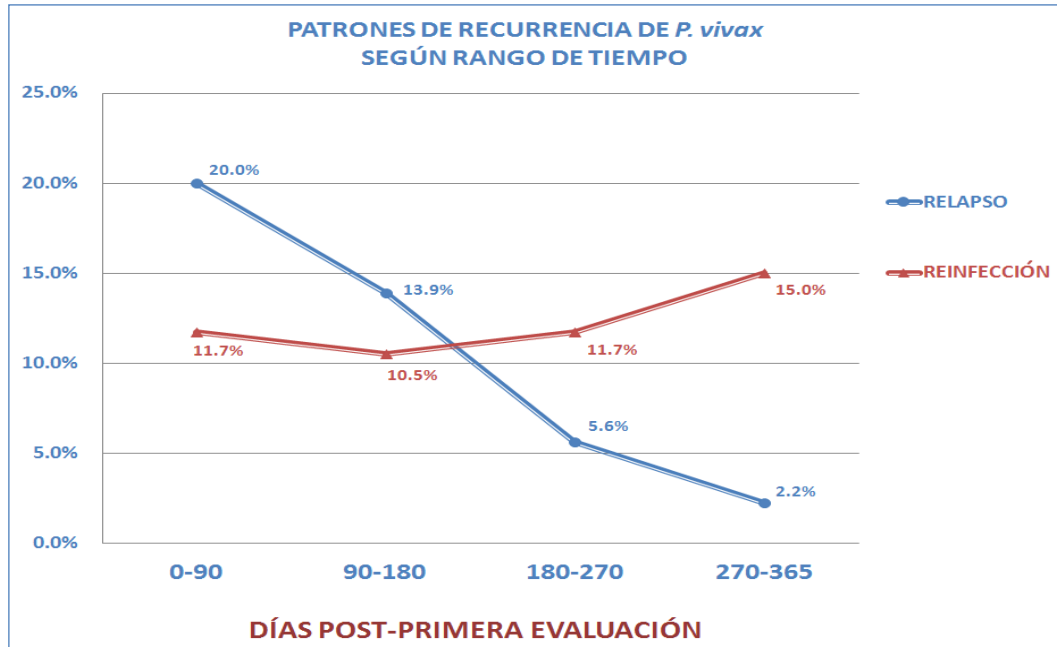


En la distribución de las recurrencias según el rango de tiempo, entre 0 a 90 días, se observa 20% (36/180) de recurrencias por haplotipos idénticos o relapsos por hipnozoitos homólogos y 11,7% (21/180) de recurrencias por haplotipos diferentes que pueden ser consideradas como reinfecciones o relapsos por hipnozoitos heterólogos. Las recurrencias por haplotipos idénticos muestran una disminución de 13,9% (25/180) a 5,6% (10/180) y 2,2% entre 180, 270 y 365 días post-primera evaluación, respectivamente, siendo consideradas como relapsos por hipnozoitos homólogos o reinfecciones con parásitos genéticamente idénticos.

Por otra parte las recurrencias por haplotipos diferentes o reinfecciones incrementan mientras mayor sea el rango de tiempo de 10,5% (19/180) a 11,7% (21/180) y 15% (27/180) en los mismos periodos de tiempo. (Tabla 7 y Fig. 7). El análisis de  $X^2$  mostró una relación altamente significativa ( $X^2=24,9$ ;  $p<0,01$ ; 99% de confiabilidad) entre las recurrencias por haplotipos idénticos o diferentes y el rango de tiempo post-primera evaluación.

**Tabla 7. Análisis de los patrones de recurrencia según el rango de tiempo, de 0 a 365 días post- primera evaluación.**

| <b>PATRONES DE RECURRENCIA SEGÚN RANGO DE TIEMPO</b> |                   |                   |                   |                   |
|--|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| <b>DÍAS POST-1ºEVALUACIÓN</b>                        | <b>0-90</b>       | <b>90-180</b>     | <b>180-270</b>    | <b>270-365</b>    |
| <b>RELAPSO</b>                                       | 20,0%<br>(36/180) | 13,9%<br>(25/180) | 5,6%<br>(10/180)  | 2,2%<br>(4/180)   |
| <b>REINFECCIÓN</b>                                   | 11,7%<br>(21/180) | 10,5%<br>(19/180) | 11,7%<br>(21/180) | 15,0%<br>(27/180) |



**Fig. 7. Patrones de recurrencia según el rango de tiempo.** Chi-cuadrado ( $X^2$ )=24.9  $p < 0.01$ ; 99% de confiabilidad, con una relación altamente significativa entre la variabilidad genética y el rango de tiempo en que se presentaron las recurrencias.

#### 6.4. MECANISMOS DE RESISTENCIA

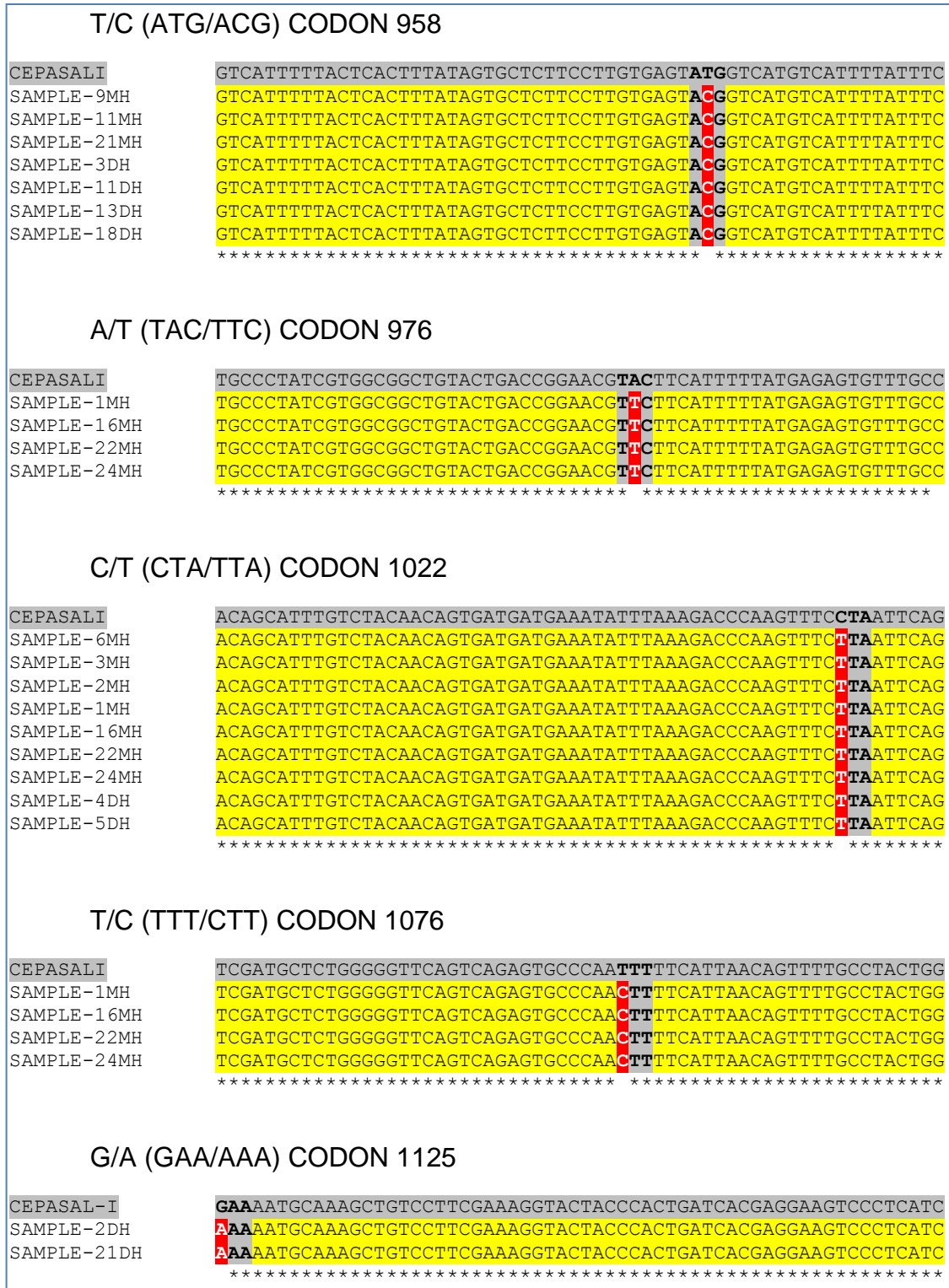
Se realizó la PCR convencional para la amplificación del fragmento de 800 pb del gen *pvmdr1*. El número de muestras obtenidas al azar, amplificadas y sometidas al análisis de secuenciamiento, fue de 50. Estas muestras fueron divididas en 2 grupos de 25, provenientes de individuos con relapso y con reinfección, identificadas en diferentes días post-primera evaluación. El análisis de las secuencias nucleotídicas se realizó mediante el programa Clustal W, tomando como referencia a la cepa Sal1 (Salvador).

En este análisis se identificaron alelos *wild-type* en el 64% (32/50) de muestras, 15 con relapso y 17 con reinfección, también se identificaron alelos mutantes con 1 SNPs sinónimo y 1 o 2 SNPs no sinónimos en el 36% (18/50) de muestras, 10 con relapso y 8 con reinfección. En total fueron identificados 5 SNPs;

en las posiciones de los codones 958 (ATG/ACG), 976 (TAC/TTC), 1022 (CTA/TTA), 1076 (TTT/CTT) y 1125(GAA/AAA). (Fig. 8).

Las secuencias nucleotídicas fueron sometidas al proceso de transducción *in silico* mediante el software *Translate a DNA Sequence*, el cual permitió identificar el cambio de aminoácidos en la proteína MDR1. Mediante este proceso fueron identificados 4 mutaciones no sinónimas o cambio de aminoácidos en los codones M958T, Y976F, F1076L y E1125K (Fig. 9) y 1 mutación sinónima, el cual no originó cambio de aminoácidos, en el codón L1022L.

En el grupo de muestras de individuos con relapso, 12% (3/25) presentaron SNPs únicos sinónimos en el codón L1022L. Así mismo 12% (3/25) presentaron SNPs únicos no sinónimos en el codón M958T y 16% (4/25) presentaron SNPs dobles no sinónimos en el codón Y976F y F1076L, estos últimos están reportados como posibles marcadores de resistencia a cloroquina por *P. vivax* (Fig. 10A). En el grupo de individuos con reinfección, 8% (2/25) presentaron SNPs únicos sinónimos en el codón L1022L, 24% (6/25) presentaron SNPs únicos no sinónimos, 4 en el codón M958T y 2 en el codón E1125K, los cuales no están relacionados con mecanismos de resistencia. (Fig. 10B). Mediante el análisis estadístico se encontró una relación significativa entre la presencia de SNPs que originan mutaciones no sinónimas y la ocurrencia de relapsos con  $X^2=3.84$ ;  $p<0.05$ , correspondiente al 95% de confiabilidad.



**Fig. 8. SNPs en los codones del gen *pvmdr1*.** Hi: Haplotipo idéntico, Hd: Haplotipo diferente. Análisis de las secuencias nucleotídicas presentando 5 SNPs, en posiciones 958, 976, 1076 1022 y 1125.

## MUTACIÓN M958T

```
CEPASAL-I      VIFTHFIVLFLVSMVMSFYFCPIVAAVLTGTYFIFMRVFAIRARIAANKDVEKRVNQP  
SAMPLE-9MH    VIFTHFIVLFLVSTVMSFYFCPIVAAVLTGTYFIFMRVFAIRARIAANKDVEKRVNQP  
SAMPLE-11MH   VIFTHFIVLFLVSTVMSFYFCPIVAAVLTGTYFIFMRVFAIRARIAANKDVEKRVNQP  
SAMPLE-21MH   VIFTHFIVLFLVSTVMSFYFCPIVAAVLTGTYFIFMRVFAIRARIAANKDVEKRVNQP  
SAMPLE-3DH    VIFTHFIVLFLVSTVMSFYFCPIVAAVLTGTYFIFMRVFAIRARIAANKDVEKRVNQP  
SAMPLE-11DH   VIFTHFIVLFLVSTVMSFYFCPIVAAVLTGTYFIFMRVFAIRARIAANKDVEKRVNQP  
SAMPLE-13DH   VIFTHFIVLFLVSTVMSFYFCPIVAAVLTGTYFIFMRVFAIRARIAANKDVEKRVNQP  
SAMPLE-18DH   VIFTHFIVLFLVSTVMSFYFCPIVAAVLTGTYFIFMRVFAIRARIAANKDVEKRVNQP  
*****
```

## MUTACIÓN Y976F

```
CEPASAL-I      VIFTHFIVLFLVSMVMSFYFCPIVAAVLTGTYFFIFMRVFAIRARIAANKDVEKRVNQP  
SAMPLE-1MH    VIFTHFIVLFLVSMVMSFYFCPIVAAVLTGTYFFIFMRVFAIRARIAANKDVEKRVNQP  
SAMPLE-16MH   VIFTHFIVLFLVSMVMSFYFCPIVAAVLTGTYFFIFMRVFAIRARIAANKDVEKRVNQP  
SAMPLE-22MH   VIFTHFIVLFLVSMVMSFYFCPIVAAVLTGTYFFIFMRVFAIRARIAANKDVEKRVNQP  
SAMPLE-24MH   VIFTHFIVLFLVSMVMSFYFCPIVAAVLTGTYFFIFMRVFAIRARIAANKDVEKRVNQP  
*****
```

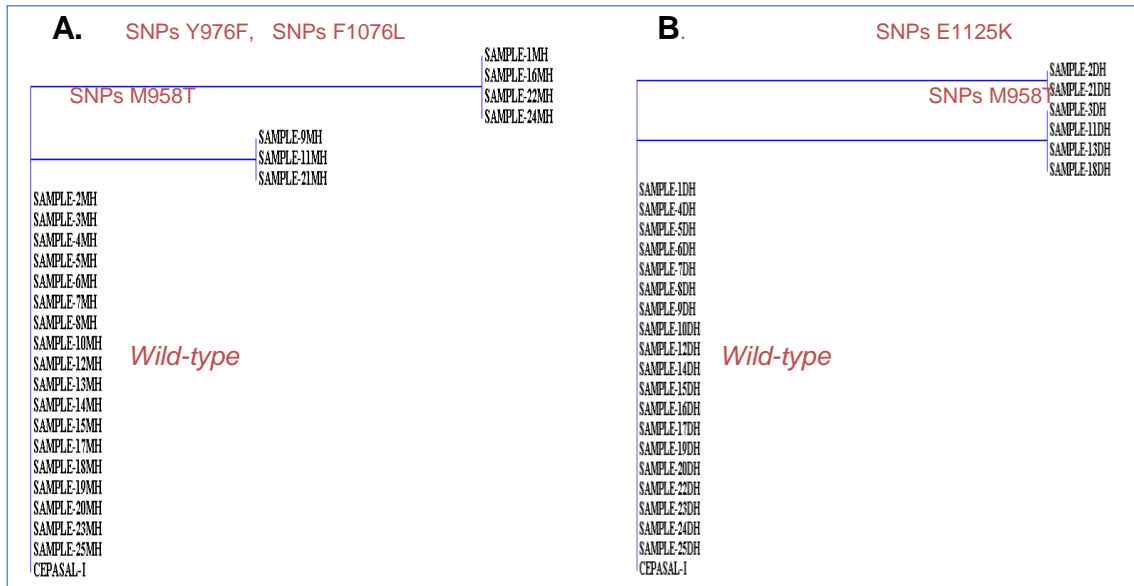
## MUTACIÓN F1076L

```
CEPASAL-I      SMLWGFSQSAQFFINSFAYWFGSFLIRRGTIQVDDFMKSLFTFLFTGSYAGKLMSLKGDS  
SAMPLE-1MH    SMLWGFSQSAQLFINSFAYWFGSFLIRRGTIQVDDFMKSLFTFLFTGSYAGKLMSLKGDS  
SAMPLE-16MH   SMLWGFSQSAQLFINSFAYWFGSFLIRRGTIQVDDFMKSLFTFLFTGSYAGKLMSLKGDS  
SAMPLE-22MH   SMLWGFSQSAQLFINSFAYWFGSFLIRRGTIQVDDFMKSLFTFLFTGSYAGKLMSLKGDS  
SAMPLE-24MH   SMLWGFSQSAQLFINSFAYWFGSFLIRRGTIQVDDFMKSLFTFLFTGSYAGKLMSLKGDS  
*****
```

## MUTACIÓN E1125K

```
CEPASAL-I      ENAKLSFERYYPLITRKSLIDVRDNGGIKIKNSNDIKG  
SAMPLE-2DH    KNAKLSFERYYPLITRKSLIDVRDNGGIKIKNSNDIKG  
SAMPLE-21DH   KNAKLSFERYYPLITRKSLIDVRDNGGIKIKNSNDIKG  
*****
```

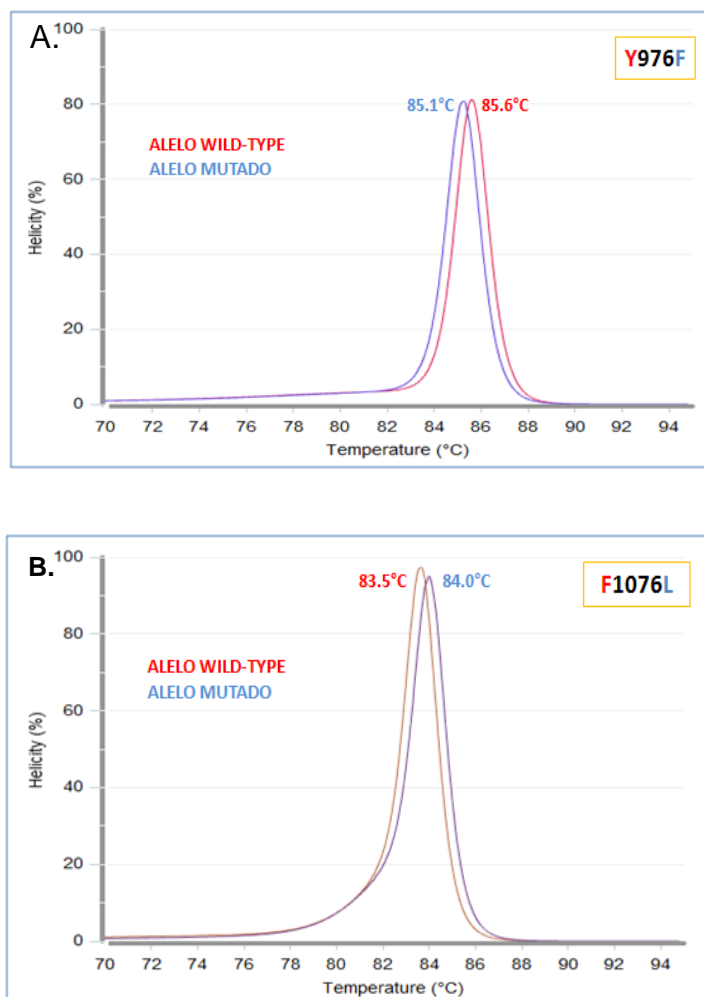
**Fig. 9. Mutaciones no sinónimas en las secuencias aminoacídicas de la proteína MDR1.** Hi: Haplotipo idéntico, Hd: Haplotipo diferente. Análisis de las mutaciones no sinónimas (marcadas en azul) originando el cambio de aminoácidos M/T en el codón 958, Y/F en el codón 976, F/L en el codón 1076 y E/K en el codón 1125.



**Fig. 10. Distribución de SNPs codificando mutaciones sinónimas y no sinónimas (Cladograma). A.** Distancias filogenéticas en casos con relapso, **B.** Distancias filogenéticas en casos con reinfección.

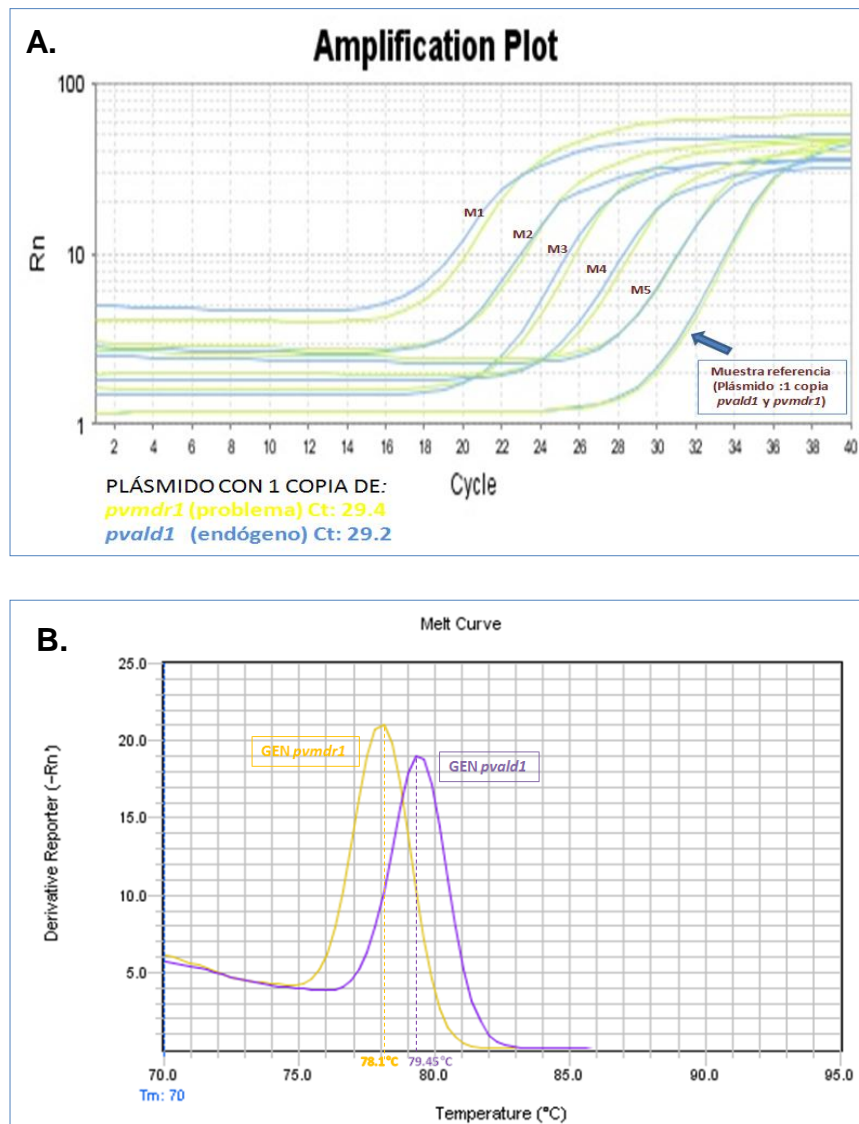
Mediante el análisis *in silico*, con el software *U-Melt*, se identificaron las temperaturas de fusión en alta resolución (HRM), distinguiendo claramente los SNPs en alelos mutantes así como los alelos *wild-type* en los codones 976 y 1076 del gen *pvmdr1*. Se analizaron fragmentos pequeños de hasta 100 pb correspondientes a regiones con las mutaciones no sinónimas relacionadas con resistencia. Se encontraron diferencias en los picos de las temperaturas de fusión de ambos alelos Y976F y L1076F de hasta 0,5°C. El análisis mostró una temperatura de 85,6°C para el alelo *wild-type* Y976 y 85,1°C para el alelo mutante F976 (Fig. 11A). También se observó una temperatura de 83,5°C para el alelo *wild-type* L1076 y 84°C para el alelo mutante F1076. (Fig.11B).

### ANÁLISIS U-MELT



**Fig. 11. U-Melt de secuencias nucleotídicas del gen *pvmr1*.** Análisis HRM de las temperaturas de fusión **A.** Curvas de melting en la mutación Y976F y **B.** Curvas de melting en la mutación F1076L.

El número de copias del gen *pvmr1* fue exitosamente medido en el 100% (50/50) de las muestras, sometidas previamente al análisis de secuenciación. La amplificación de la muestra de referencia, en este caso el plásmido (calibrador) diluido, conteniendo hasta 1 copia de los fragmentos *pvald1* y *pvmr1*, mostraron un Ct de 29,2 y 29,4 respectivamente, en 40 ciclos de amplificación (Fig. 12A). La diferencia entre ambos genes se pudo establecer mediante los picos de las temperaturas de fusión. Se observó una temperatura de 79,3 +/- 0,2°C para el gen *pvald1* y una temperatura de 77,9 +/- 0,2°C para el gen *pvmr1* (Fig. 12B).

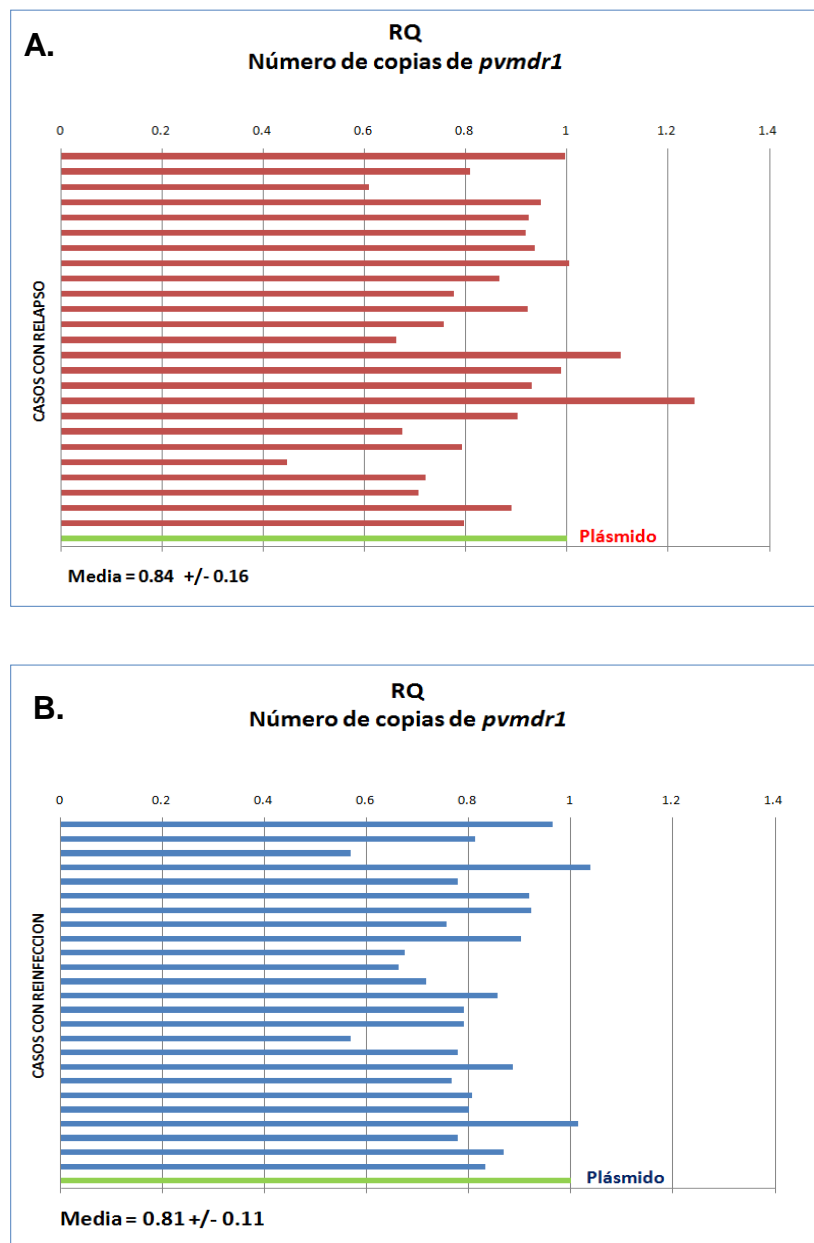


**Fig. 12. Amplificación mediante qPCR Real time- SYBR Green I (Cuantificación Relativa).** **A.** Análisis de  $\Delta C_t$  (ciclo de amplificación comparativa) entre *pvald1* (gen endógeno) y *pvmdr1* (gen problema). M1-M5: Muestras de individuos con recurrencia. Plásmido 1 copia: Muestra de referencia, **B.** Curvas de melting en los genes *pvald1* (78,1°C) y *pvmdr1* (79,4°C).

El número de copias del gen *pvmdr1* se determinó mediante el sistema de  $\Delta\Delta C_t$  comparativo, utilizando el gen de copia única *pvald1* como gen endógeno (normalizador). De esta manera en el grupo de muestras de individuos con relapso, 8% (2/25) presentaron un ligero incremento en el número de copias con 1,1 y 1,2 copias, la media fue de 0,84 +/- 0,16 copias/gen (Fig. 13A). En el grupo



de individuos con reinfección, ninguno mostró un incremento en el número de copias, con una media de 0,81 +/- 0,11 copias/gen (Fig. 13B).



**Fig. 13. Número de copias del gen *pvmdr1* de *P. vivax*. A.** RQ en los casos con haplotipos idénticos, **B.** RQ en los casos con Haplotipos diferentes. Plásmido (calibrador): 1 copia de *pvmdr1* y *pvald1*. RQ: Cuantificación relativa

## VII. DISCUSIÓN

### 7.1. DETECCIÓN DE LA MALARIA DURANTE LA VIGILANCIA ACTIVA

Estudios realizados por Mayxay *et al.*, 2001, mencionan que en muchas regiones endémicas existen problemas y limitaciones, asociadas con la dependencia al diagnóstico microscópico, para la detección de casos activos y pasivos de la malaria. Por su parte Siripoon *et al.*, 2002, indican que en el caso de individuos sintomáticos con relativa alta parasitemia (>500 parásitos asexuales/ $\mu$ l) el diagnóstico por microscopía puede ser agudo y usado para iniciar un apropiado tratamiento, sin embargo la agudeza de este método puede disminuir significativamente en los casos de individuos con bajos niveles de parasitemia, como en aquellos individuos asintomáticos donde los rangos de parasitemia son a menudo muy bajos. Una solución a este problema es el uso de técnicas novedosas como la PCR, planteado por Singh *et al.*, 1999, la cual ofrece alta sensibilidad y especificidad para la detección del DNA genómico de *Plasmodium*, además es efectiva para la determinación de infecciones mixtas. Barker *et al.*, 1992 y Snounou *et al.*, 1993 indicaron que la PCR fue más sensible y específico que la examinación microscópica por gota gruesa y frotis sanguíneo, particularmente en casos con baja parasitemia o infecciones mixtas. Por su parte Andrade *et al.*, 2010 usaron una variante, el Nested PCR, para el diagnóstico de *Plasmodium*, el cual fue utilizado como prueba estándar en diversos estudios.

En Mazán-Iquitos, el uso del Nested PCR para el diagnóstico de *Plasmodium* presentó una alta capacidad de discriminación entre las especies, identificación de infecciones mixtas, además de una alta sensibilidad comparada con la microscopía. Se detectó tan solo 0,9% (2/222) de muestras negativas para el Nested PCR y positivas por microscopía, lo cual está relacionado con las bajas densidades observadas, < 50 parásitos/ $\mu$ l. Estos resultados también son observados por Scopel *et al.*, 2004 quienes determinaron que el uso de DNA

extraído a partir del frotis sanguíneo presentó una pobre detección de malaria, particularmente con densidades menores a 20 parásitos/ $\mu$ l.

Los hallazgos en este estudio mostraron individuos asintomáticos con altas frecuencias de infecciones por *P. vivax* y bajas por *P. falciparum*, condiciones similares a las reportadas en Venezuela por Rodulfo *et al.*, 2007, quienes indicaron infecciones asintomáticas de 34,8% para *P. vivax* y 15,2% para *P. falciparum*. Otros estudios como de Orjuela *et al.*, 2009 en la amazonía brasileña, indicaron bajos índices de transmisión tanto en *P. vivax* como en *P. falciparum*, con un alto número de individuos asintomáticos no detectados. Esto es corroborado por Sojo *et al.*, 2008 y Sutton *et al.*, 2009, por estudios realizados en la amazonia peruana.

Generalmente los estudios epidemiológicos no consideran las altas frecuencias de infecciones asintomáticas, por lo que es necesario el empleo de métodos de vigilancia activa para la detección de las especies de *Plasmodium*. Este es el principal problema en muchas regiones endémicas del mundo, debido principalmente a que los individuos desarrollan un incremento de la inmunidad y resistencia a la enfermedad, después de repetidas infecciones, lo cual minimiza la intensidad de los síntomas, manteniendo bajos niveles parasitemia por largos períodos de tiempo. Este hecho es epidemiológicamente importante ya que los portadores asintomáticos son un reservorio frecuente de la infección. Al respecto, en Cali-Colombia, Echeverri *et al.*, 2011 reportaron un caso de malaria transmitida por transfusión a un recién nacido prematuro, por la sangre infectada de un donante asintomático. La prueba de la gota gruesa confirmó la enfermedad por *Plasmodium vivax* en el recién nacido y la muestra del donante se sometió a PCR y fue positiva para la misma especie.

## 7.2. VARIABILIDAD POLIMÓRFICA DEL GEN *pvmSP3-α*

La genotipificación realizada en las muestras de Mazán, se basó en el polimorfismo del gen *pvmSP3-α*, varios estudios como los efectuados en Guyana Francesa por Verón *et al.*, 2009, en Perú por Ayala *et al.*, 2005, en Colombia por Cristiano *et al.*, 2008 y en Brasil por Ribeiro *et al.*, 2011, también utilizaron este gen como marcador genético para evaluar la diversidad poblacional de *P. vivax*.

La genotipificación mediante el Nested-PCR permitió detectar 2 secuencias alélicas diferentes, de 1900 pb (Alelo A) y de 1500 pb (Alelo B). Adicionalmente, investigaciones realizadas por Bruce *et al.*, 1999 en Papúa Nueva Guinea y Cui *et al.*, 2003 en Tailandia, reportaron un tercer alelo de 1100 pb (Alelo C), incluso investigaciones realizadas por Prajapati *et al.*, 2010 en la India (Chennai), mencionaron a un cuarto alelo de 500 pb (Alelo D). En este estudio, los resultados de las frecuencias para estos alelos (A y B) son concordantes con los reportados por Bruce *et al.*, 1999, quienes indicaron un 70,5% y 6,7% y por Cui *et al.*, 2003, quienes indicaron un 74,8% y 6,5%, respectivamente. Sin embargo en regiones como Venezuela Ord *et al.*, 2005, indicaron 9,3% para el alelo A y 21,9% para el alelo B. Incluso contrastando con la mayoría de investigaciones de esta parte del mundo, un estudio realizado en el Sur de Irán por Zakeri *et al.*, 2006 mencionaron al alelo C como el más prevalente. Estos resultados nos muestran un predominio de determinado tipo alélico, por una determinada región, aunque con una escasa variabilidad genética de *P. vivax*, considerando al alelo A como el más prevalente en muchas regiones endémicas.

Mediante la utilización de técnicas de genotipificación combinadas como la PCR–RFLP, se observó una mayor variabilidad genética en *P. vivax*. Se identificaron 10 haplotipos monoclonales con la enzima *Hha I* y 7 con *Alu I*, de los cuales 6 con *Hha I* y 3 con *Alu I*, también fueron encontrados por Prajapati *et al.*, 2011 en la India, por Cui *et al.*, 2003 en Tailandia y por Zakeri *et al.*, 2006 en Irán y al menos 3 fueron encontradas por Bruce *et al.*, 1999 en Papúa Nueva Guinea;

sugiriendo que algunas de estas variantes alélicas tienen una distribución global. Por otra parte también se pudo observar modificaciones en los patrones enzimáticos del alelo B, identificado por Ribeiro *et al.*, 2011 en Brasil, el cual presentó diferentes tamaños de fragmentos digeridos comparados con los encontrados en este estudio. Al igual que en otros estudios también se identificaron haplotipos policlonales, los cuales representan el 9,5% (5,6% en la primera evaluación y 3,9% en la segunda evaluación) de los casos, contrariamente, Ribeiro *et al.*, 2011 indicaron 14% de infecciones policlonales analizadas solo con la enzima *Hha I*, por su parte Bruce *et al.*, 1999 y Cui *et al.*, 2003 también encontraron un mayor número de infecciones policlonales o mixtas.

La variabilidad genética mostrada por *P. vivax* indica que la diversidad de este parásito es mantenida por una selección positiva, sin embargo puede haber otras razones incluyendo algunas de las propiedades biológicas del parásito tales como su habilidad para ocasionar relapsos, interacción con poblaciones de *P. falciparum* co-circulantes o por la migración de personas infectadas desde una región a otra. Esta posibilidad es de especial atención porque durante los últimos años, parte de la población rural de la selva peruana ha sido sujeta a constante y continuo desplazamiento. En este estudio la variabilidad genética fue evaluada determinando los niveles de significancia de la diversidad poblacional (PLD) en base a la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) y la complejidad de la infección (COI). Los datos encontrados coinciden con el estudio efectuado por Sutton *et al.*, 2009, en la amazonía peruana, en donde mencionaron un PLD cercano a la unidad ( $H_e=0,845$ ), pero un 23,6% de infecciones policlonales ( $COI>1$ ), siendo mayores a los porcentajes encontrados en este estudio.

### 7.3. PATRONES DE RECURRENCIA

En este estudio se encontró 81% de recurrencias por *P. vivax* en un periodo de 365 días post-primera evaluación, por su parte Orjuela *et al.*, 2009b, reportaron rangos de recurrencia entre 26% a 40% dentro de 180 días post-tratamiento. Mediante métodos de genotipificación, Chen *et al.*, 2007 asociaron un solo tipo alélico al 99 % de las recurrencias y 71% a tipos alélicos similares, en 2 episodios, con un intervalo de tiempo entre 29 y 343 días, lo cual es concordante con el periodo de tiempo que se utilizó para evaluar las recurrencias en este estudio, identificándose 41,7% de recurrencias por haplotipos idénticos o relapsos y 48,9% de recurrencias por haplotipos diferentes o reinfecciones. Otros estudios como el de Hanf *et al.*, 2009 en Guyana Francesa, utilizaron rangos de tiempo e indicaron que el incremento de los relapsos se produjo en los primeros 3 meses después del episodio inicial, posterior a esto, la mayoría de ataques secundarios fueron producto de reinfecciones. En regiones endémicas más próximas, como Colombia, estudios realizados por Álvarez *et al.*, 2006 también indicaron que el tiempo en que se presentan las recurrencias (relapsos), en pacientes sometidos a diferentes esquemas de tratamiento, fluctúan entre 53 a 129 días después del episodio inicial. Estos reportes fueron concordantes con los relapsos que muestra una cepa tropical y al igual que en este estudio, la mayor frecuencia de recurrencias por haplotipos idénticos o relapsos se produjeron durante los primeros 3 meses después de la infección primaria, posterior a este periodo se incrementaron las frecuencias de recurrencias por haplotipos diferentes o reinfecciones.

Las recurrencias por reinfecciones son comunes en regiones endémicas ya que los individuos permanecen en la misma zona todo el tiempo y es más probable que pueden adquirir rápidamente una nueva infección, sin embargo estas deducciones deben interpretarse con cuidado ya que estos individuos también pueden tener un relapso causado por activación de hipnozoitos heterólogos. Al respecto Imwong *et al.*, 2007 reportaron infecciones recurrentes, por parásitos no relacionados con la infección primaria, en 78% de individuos provenientes de

Tailandia y 63% en India, en estos casos la reactivación de hipnozoitos heterólogos podría ser la principal causa de las recurrencias. Concordante con estos datos, la OMS en el 2006 informó frecuencias bajas de relapsos que varían desde 11% en la India hasta 51% en Afganistán, con valores intermedios de 30% en Indonesia.

En este estudio, las altas frecuencias de reinfecciones y relapsos pueden ser relacionados con un posible incremento de la inmunidad adquirida y por consiguiente la resistencia a las complicaciones de la enfermedad e incremento en el número de portadores asintomáticos. Esta forma de la malaria fue identificada por Loyola, 1991 quien mencionó, que en regiones endémicas, tras prolongados periodos de infección, las personas adquieren un alto grado de inmunidad y la malaria asintomática es frecuente. Además Branch *et al.*, 2005 señalan que durante las recurrencias la respuesta inmune es más rápida y amplificada.

Finalmente, al igual que Alyson *et al.*, 1996 concordamos que el manejo y control de *P. vivax* es complicado por su habilidad de causar relapsos y por las continuas reinfecciones en zonas endémicas, por lo cual es necesario una detección e identificación oportuna del tipo de infección malárica.

#### **7.4. MECANISMOS DE RESISTENCIA**

Reportes como el de Baird *et al.*, 1991; Phillips *et al.*, 1996 y Brega *et al.*, 2005 relacionaron la CQR con el polimorfismo de nucleótidos únicos o SNPs, en el gen de resistencia *pvm-dr1* de *P. vivax*. En este estudio, por el análisis de secuenciamiento, se identificó 16% (4/25) de muestras infectadas con un alelo doble mutante, con mutaciones no sinónimas en los 2 codones Y976F-F1076L relacionados con resistencia. Estas mutaciones son observadas también por Suwanarusk *et al.*, 2007 en Indonesia y Tailandia, lugares donde se realizaron estudios de susceptibilidad a la cloroquina, *in vitro*. Frecuencias más altas son

reportadas por Brega *et al.*, 2005, encontrando 26% (6/23) de aislados, 4 desde Tailandia y 2 desde Indonesia con el alelo Y976F y 61% (14/23) de aislados con el alelo F1076L, 5 desde Tailandia, 4 de los cuales también tuvieron la mutación en el codón Y976F, 4 desde Azerbaiyán, 3 desde Turquía y 2 desde Indonesia, los cuales también tuvieron la mutación en el codón Y976F. Otros estudios como el de Dua *et al.*, 1996, efectuados en poblaciones que presentan CQR definido como la India, Papúa Nueva Guinea y Myanmar muestran un incremento de estas mutaciones, por lo que se podría especular que estos 2 SNPs serían marcadores moleculares tempranos que indiquen CQR en *P. vivax*.

Las muestras para el secuenciamiento fueron obtenidas al azar, debido principalmente a que las mismas no fueron colectadas a través de un seguimiento estricto para determinar la eficacia o falla del tratamiento, sin embargo todos los individuos positivos inicialmente a microscopía (primera evaluación), que representan el 89.1% de la población analizada, fueron sometidos a tratamiento por 3 días con cloroquina. Al respecto, varios estudios de sensibilidad a este fármaco, como los efectuados por Trenton *et al.*, 2003 en la región amazónica y en la costa del pacífico de Perú, recomiendan un seguimiento de 28 días para determinar la eficacia de cloroquina *in vivo*.

Otros estudios en Sudamérica como los efectuados en Colombia y Brasil, por Soto *et al.*, 2001 y Alecrim, 1999 también indican periodos similares de seguimiento. Incluso estudios efectuados en Madagascar por Barnadas *et al.*, 2008, indican que los pacientes deben someterse a un régimen de seguimientos acorde a los lineamientos recomendados por la OMS en el 2001. A pesar de las limitaciones, en este estudio, cabe resaltar lo mencionado por Brega *et al.*, 2004, quienes señalan que la identificación de genes potencialmente involucrados en la resistencia a drogas y sus variaciones moleculares, podrían proveer un esquema para estudiar la incidencia y propagación de cepas de *P. vivax* resistentes a drogas.



Por otra parte un aporte importante de este estudio fue el uso del software U-Melt, para el análisis *in silico* del HRM, el cual permitió establecer diferencias entre los SNPs de los alelos mutantes con los alelos *wild type*. Estos datos son una información útil para poder discriminar fácilmente la presencia de determinados SNPs que originen mutaciones no sinónimas en la secuencia de aminoácidos. Ensayos similares utilizando la PCR en Tiempo Real para analizar HRM fueron implementados por Alonso *et al.*, 2010, la cual permitió diferenciar fácilmente distintos alelos de un gen, con presencia o ausencia de SNPs en determinados codones.

En relación a la cuantificación relativa, Brega *et al.*, 2005 indicaron que la sobreexpresión del gen *pvmdr1* de *P. vivax* ha sido asociada con resistencia a drogas como cloroquina, estudios similares en *P. falciparum* como el efectuado por Ferreira *et al.*, 2006, evaluaron el número de copias del gen *pfmdr1* utilizando como gen endógeno a la Actina, y mostraron un incremento de 3 veces respecto a la cepa de referencia (cepa 3D7). En este estudio el análisis del número de copias del gen *pvmdr1*, utilizando como gen endógeno a la Aldolasa, no mostró ningún incremento significativo tanto en las muestras de individuos con relapso así como en los que presentaron reinfección.

La importancia de realizar un diagnóstico preciso reside primeramente en determinar la especie de *Plasmodium* que causa la enfermedad, así mismo es necesario establecer la recurrencia de la infección, a fin de que el paciente reciba el tratamiento adecuado. Además Bray *et al.*, 2005 mencionaron la importancia de la variabilidad genética de *P. vivax* en el flujo de genes como los que confieren resistencia, Brega *et al.*, 2005 también mencionaron que la resistencia a cloroquina podría deberse a que la diversidad genética de *P. vivax* tiende a variar según el área geográfica, por lo tanto se considera necesario efectuar estudios similares en diferentes regiones geográficas endémicas para *P. vivax*.

## VIII. CONCLUSIONES

- En individuos asintomáticos provenientes de una región endémica como Mazán, el diagnóstico mediante Nested PCR, a partir de muestras secuenciales evaluadas durante un año de seguimiento activo, permitió detectar altas recurrencias de la infección por *P. vivax*.
- La genotipificación, en base al gen *pvmSP3-α*, utilizando sólo el Nested PCR no fue suficiente para establecer una clara variabilidad, sin embargo la posterior digestión de los productos de amplificación, combinando enzimas como *Alu I* y *Hha I*, permitió identificar diversos haplotipos. Los valores de COI>1 y PLD (He) fueron concordantes con una alta variabilidad genética, logrando identificarse infecciones mixtas por haplotipos policlonales e infecciones simples por haplotipos monoclonales.
- En individuos con infección recurrente por *P. vivax*, se identificó que la recurrencia se debía a una reinfección cuando se observaron haplotipos diferentes a la infección primaria y a un relapso cuando se observaron haplotipos idénticos. Además concordante con el comportamiento de cepas tropicales, los relapsos fueron más frecuentes que las reinfecciones durante los primeros 90 días después de la infección primaria, posterior a este periodo las reinfecciones fueron más frecuentes.
- Los SNPs dobles mutantes, causantes de mutaciones no sinónimas, en los codones Y976F y F1076L del gen *pvmdr1* de *P. vivax*, previamente relacionados con resistencia, fueron identificados solo en 4 individuos con relapso. Además no se mostró ninguna variación cuantitativa en el gen *pvmdr1*, que sea significativa e indique resistencia, tanto en las muestras de individuos con relapso y con reinfección.

## IX. RECOMENDACIONES

- ❖ En regiones endémicas de baja transmisión de la malaria, se debe tomar en cuenta la persistencia de infecciones asintomáticas y el incremento de las recurrencias principalmente debidas a reinfecciones o relapsos.
- ❖ Para una mejor caracterización de la variabilidad genética de *P. vivax*, se requiere analizar un gran número de muestras, así mismo también es necesario utilizar, en conjunto, otros marcadores genéticos para proveer un mayor análisis de variabilidad.
- ❖ Para estudios de evaluación de la variabilidad genética de *P. vivax* mediante PCR-RFLP, es necesario utilizar por lo menos 2 enzimas de restricción. Debido a que infecciones inicialmente clasificadas como simples, basadas en los resultados de digestión con una sola enzima, posteriormente pueden ser identificadas como infecciones mixtas con una segunda enzima e incluso la utilización de una tercera enzima proporcionaría mayor información de la diversidad genotípica.
- ❖ Para determinar los patrones de recurrencia, en futuras investigaciones, es necesario evaluar como mínimo 2 muestras secuenciales por paciente, con seguimiento terapéutico durante los primeros 28 días hasta 3 meses post-infección primaria. Se recomienda evaluar los relapsos y las reinfecciones después de un mes de la infección primaria. La resistencia por el contrario debe ser evaluada antes de este periodo, por lo general se recomienda seguimientos a los 0, 7, 14 y 28 días.
- ❖ En estudios de enfermedades transmisibles como la malaria por *P. vivax*, no solo es necesario la utilización de marcadores genéticos de resistencia para discriminar la falla a tratamiento o relapso desde hipnozoitos homólogos, sino también aplicar otros procedimientos de inmunoserología, que podrían ayudar a distinguir entre nuevas infecciones o relapsos.

## X. BIBLIOGRAFÍA

1. Alecrim G. C. 2000. Estudio clínico, resistencia e polimorfismo parasitario na malaria pelo *Plasmodium vivax*, em Manaus-AM. Ph.D. thesis. Universidad de Brasília, Brasilia, Brazil.
2. Alonso M., Navarro Y., Barletta F., Martinez M., Gotuzzo L., Bouza E., Garcia D., 2010. A novel method for the rapid and prospective identification of Beijing *Mycobacterium tuberculosis* strains by high-resolution melting analysis. University Cayetano Heredia Lima-Peru. *Clin Microbiol Infect.* 1: 32-35.
3. Alvarez G. 2006. Efficacy of three choroquine-primaquine regimens for treatment of *Plasmodium vivax* malaria in Colombia. *Am J Trop, Med Hyg.* 75(4): 605-609.
4. Alves F. P., Durlacher R. R., Menezes M. J., Krieger H., Silva L. H., Camargo E. P., 2002. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. *Am J Trop. Med Hyg.* 66:641-648.
5. Alyson A., Craig and Kevin C. K., 1996. Molecular Analysis of Strains of *Plasmodium vivax* from Paired Primary and Relapse Infections. The Journal of Infectious Diseases. Tropical Disease Unit. Toronto Hospital. 200 Elizabeth St., Toronto, Canada, 174:373-9.
6. Andrade B. B., Reis-Filho A., Souza-Neto S. M., Clarêncio J., Camargo L. M., Barral A., Barral-Netto M., 2010. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. Fundação Oswaldo Cruz – Brazil. *Malaria Journal.* 9:13.
7. Aramburu G. J., Ramal A. C., Witzig R. 1999. Malaria reemergence in the Peruvian Amazon region. *Emerg Infect Dis.* 5:209-215.
8. Ayala E., Lescano A. G., Gilman R. H., Calderon M., Pinedo V., Terry H., Cabrera L., Vinetz J. 2005. Polymerase Chain Reaction and Molecular Genotyping To Monitor Parasitological Response To Anti-Malarial

- Chemotherapy in the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med. Hyg.* 74(4): 546-553.
9. Babiker H. A., Pringle S. J., Abdel-Muhsin A., Mackinnon M., Hunt P., Walliker D., 2001. High-level chloroquine resistance in Sudanese isolates of *Plasmodium falciparum* is associated with mutations in the chloroquine resistance transporter gene *pfcr* and the multidrug resistance gene *pfmdr1*. *J Infect Dis.* 183:1535–1538.
  10. Baird J. K., Basri H., Subianto B., Patchen L. C., Hoffman S. L., 1991. Resistance to chloroquine by *Plasmodium vivax* in Irian Jaya, Indonesia. *Am J Trop Med Hyg.* 44:547–552.
  11. Baird J. K. 2004. Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*. *Antimicrob Agents Chemother.* 48:4075–4083.
  12. Baird J. K., 2008. Real - world therapies and the problem of vivax malaria. *N Engl J Med.* 359: 2601–2603.
  13. Barker R. H., Banchongaksorn T., Courval J. M., Suwonkerd W., Rimwungtragoon K., Wirth D. F. 1992. A simple method to detect *Plasmodium falciparum* directly from blood samples using the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 46:416-426.
  14. Barnadas C., Ratsimbao A., Tichit M., Bouchier C., Jahevitra M., Picot S., Menard D. 2008. *Plasmodium vivax* Resistance to Chloroquine in Madagascar: Clinical Efficacy and Polymorphisms in *pvmdr1* and *pvcrt-o* Genes. American Society for Microbiology. *Parasitology and Tropical Medicine.* 52: 4233–4240
  15. Branch O, Casapia W. M., Gamboa D. V., Hernandez J. N., Alava F.F., Roncal N., Alvarez E., Perez E. J., Gotuzzo E., 2005. Clustered local transmission and asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria infections in a recently emerged, hypoendemic Peruvian Amazon community. *Malaria Journal* 4:27.
  16. Bray P., Deed S., Fox E., Kalkanidis M., Mungthin M., Deady L. W., Tilley L. 2005. Primaquine Synergises the Activity of Chloroquine Against

Chloroquine-Resistant *P. falciparum*. *Biochemical Pharmacology*. 70: 1158-1166.

17. Brega S., Meslin B., Monbrison F., Severini C., Gradoni L., Udomsangpetch R., Sutanto I., Peyron F., Picot S., 2005. Identification of the *Plasmodium vivax* mdr-like gene (*pvmdr1*) and analysis of single-nucleotide polymorphisms among isolates from different areas of endemicity. *J Infect Dis*. 191:272–277.
18. Bruce M. C., Galinski M. R., Barnwell J. W., Snounou G., Day K. P., 1999. Polymorphism at the merozoite surface protein-3 $\alpha$  locus of *Plasmodium vivax*: global and local diversity. *Am J Trop Med Hyg*. 61:518-525.
19. Carlton J., 2003. The *Plasmodium vivax* genome sequencing project. *Trends Parasitol*. 19: 227–231.
20. Chen N., Auliff A., Rieckmann K., Gatton M., Cheng Q., 2007. Relapses of *Plasmodium vivax* infection result from clonal hypnozoites activated at predetermined intervals. *J Infect Dis*. 195:934-941.
21. Cole-Tobian J. L., Biasor M., King C. L., 2005. High complexity of *Plasmodium vivax* infections in Papua New Guinean children. *Am J Trop Med Hyg*. 73:626-633.
22. Cogswell F. B., 1992. The Hypnozoite and Relapse in Primate Malaria. Tulane Regional Primate Research Center. Louisiana- USA. *Clinical microbiology reviews*. 1: 26-35.
23. Cristiano F. A., Pérez M. A., Nicholls R. S., Guerra A. P. 2008. Polymorphism in the *Plasmodium vivax* msp 3 $\alpha$  gene in field samples from Tierralta, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 103(5): 493-496.
24. Cui L., Mascorro C. N., Fan Q., Rzomp K. A., Khuntirat B., Zhou G., Chen H., Yan G., Sattabongkot J., 2003. Genetic diversity and multiple infections of *Plasmodium vivax* malaria in Western Thailand. *Am J Trop Med Hyg*. 68:613-619.
25. Dirección General de epidemiología. Sistema de vigilancia epidemiológica DRE SVE-2007: Etapas de la vigilancia epidemiológica.

26. Dua V. K., Kar P. K., Sharma V. P., 1996. Chloroquine resistant *Plasmodium vivax* malaria in India. *Trop Med Int Health*. 1:816–819.
27. Echeverri D., Barreto D. K., Osorio L., Cortés A., Martínez E. 2011. Malaria por *Plasmodium vivax* transmitida por transfusión de un donante asintomático a un recién nacido prematuro. *Universitario del Valle - Cali Colombia. Biomédica*. 32:8-12
28. Ferreira I. D., Rosario V., Cravo P., 2006. Real-time quantitative PCR with *SYBR Green I* detection for estimating copy numbers of nine drug resistance candidate genes in *Plasmodium falciparum*. *Malaria Journal*. 5:1.
29. Fidock D. A., Nomura T., Talley A. K., Cooper R. A., Dzekunov S. M., Ferdig M. T., Ursos L. M., Roepe P. D., Wellems T. E., 2000. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein *PfCRT* and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell*. 6:861-871.
30. Garg M., Gopinathan N., Bodhe P., Kshirsagar N. A., 1995. Vivax malaria resistant to chloroquine: case reports from Bombay. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 89: 656–657.
31. Gillet P., Bosselaers K., Cnops L., Bottieau E., Van Esbroeck M., Jacobs J. 2009. Evaluation of the SD FK70 Malaria Ag *Plasmodium vivax* Rapid Diagnostic Test in a non-endemic setting. *Malaria Journal*. 8: 129.
32. Hanf M., Stéphani A., Basurko C., Nacher M., Carme B., 2009. Determination of the *Plasmodium vivax* relapse pattern in Camopi, French Guiana. *Malaria Journal*. 8:278.
33. Hay S. I., Guerra C. A., Tatem A. J., Noor A. M., Snow R. W., 2004. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *Lancet Infect Dis*. 4:327–36.
34. Imwong M., Pukrittayakamee S., Gruner A. C., Renia L., Letourneur F., Looareesuwan S., White N. J., Snounou G., 2005. Practical PCR genotyping protocols for *Plasmodium vivax* using *Pvcs* and *Pvmsp1*. *Malar J*. 4:20.
35. Imwong M., Snounou G., Pukrittayakamee S., Tanomsing N., Kim J. R., Nandy A., Guthmann J. P., Nosten F., Carlton J., Looareesuwan S., Nair S.,

- Sudimack D., Day N. P., Anderson T. J., White N. J., 2007. Relapses of *Plasmodium vivax* infection usually result from activation of heterologous hypnozoites. *J Infect Dis.* 195:927-933.
36. Johnston S. P., Pieniazek N. J., Xayavong M. V., Slemenda S. B., Wilkins P. P., daSilva A. J. 2006. PCR as a confirmatory technique for laboratory diagnosis of malaria. *J Clinical Microb.* 44:1087-1089.
37. Kain K. C., Brown A. E., Mirabelli L., Webster H. K. 1993. Detection of *Plasmodium vivax* by Polymerase Chain Reaction in a Field Study. *Journal of Infectious Diseases.* 168: 1323-1326.
38. Koram K. 1993. Socioeconomic and environmental risk factors in severe malaria: a case control study. Unpublished phd thesis. London School of Hygiene and Tropical Medicine. University of London.
39. Kosek M., Yori P. P., Gilman R. H., Calderon M., Zimic M., Chuquiyauri R., Jeri C., Pinedo-Cancino V., Matthias M. A., Llanos-Cuentas A., Vinetz J. M. 2012. High Degree of *Plasmodium vivax* Diversity in the Peruvian Amazon Demonstrated by Tandem Repeat Polymorphism Analysis. *Am J Trop Med Hyg.* 86(4): 580–586.
40. Loyola E. 1991. Seroepidemiologia del Paludismo. Técnica del INDRE. 1:77-95
41. McKenzie F.E., Ferreira M.U., Baird J.K., Snounou G., Bossert W.H., 2001. Meiotic recombination, cross-reactivity and persistence in *Plasmodium falciparum*. *National Institutes of Health-Evolution.* 55(7): 1299–1307.
42. Mallika I., Georges S., Sasithon P., Naowarat T., Jung R. K., Amitab N., Jean-Paul G., Francois N., Jane C., Sornchai L., Shalini N., Daniel S., Nicholas P. J., Timothy J. C., Anderson J., W., 2007. Relapses of *Plasmodium vivax* Infection Usually Result from Activation of Heterologous Hypnozoites. *The Journal of Infectious Diseases.* 195:927–933.
43. Manguin S., Roberts D. R., Peyton E. L., Fernandez-Salas I., Barreto M., Fernandez L. R., Elgueta S. R., Martinez G. R., Rodriguez M. H., 1995. Biochemical systematics and population genetic structure of *Anopheles*



*pseudopunctipennis*, vector of malaria in Central and South America. *Am J Trop Med Hyg.* 53:362-377.

44. Mascorro C. N., Zhao K., Khuntirat B., Sattabongkot J., Yan G., Escalante A. A., Cui L., 2005. Molecular evolution and intragenic recombination of the merozoite surface protein MSP-3alpha from the malaria parasite *Plasmodium vivax* in Thailand. *Parasitology.* 131:25-35
45. Mayxay M., Pukritrakamee S., Chotivanich K., Imwong M., Looareesuwan S., White N. J. 2001. Identification of cryptic coinfection with *Plasmodium falciparum* in patients presenting with vivax malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 65: 588-592.
46. Mendis K., Sina B., Marchesini P., Carter R., 2001. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 64:97-106.
47. Ministerio de Salud. 2009. Dirección General de Epidemiología. Red Nacional de Control Epidemiológico. RENACE-SE 20.
48. Ministerio de Salud. 2012. Dirección General de Epidemiología. Red Nacional de Epidemiología. Dirección Regional de Salud-Loreto SE 29.
49. Mwangi T. W., Mohammed M., Dayo H., Snow R. W., Marsh K. 2005. Clinical algorithms for malaria diagnosis lack utility among people of different age groups. *Trop med Int Health.* 10:530-536.
50. Nomura T., Carlton J. M. R., Baird K., 2001. Evidence for different mechanisms of chloroquine resistance in 2 *Plasmodium* species that cause human malaria. *J Infect Dis.* 183:1653–1661.
51. Ord R., Olley S., Tami A., Sutherland C. J., 2005. High sequence diversity and evidence of balancing selection in the *Pvmsp3alpha* gene of *Plasmodium vivax* in the Venezuelan Amazon. *Mol Biochem Parasitol.* 144: 86–93.
52. Orjuela P. S., Simoes F., Machado A., Francis Y. C., Farias M. R., Gracias M. C., del Portillo H. A., 2009a. Analysis of Single-Nucleotide Polymorphisms in the crt-o and mdr1 Genes of *Plasmodium vivax* among Chloroquine-Resistant Isolates from the Brazilian Amazon Region, *Antimicrobial agents and Chemotherapy.* 1: 3561–3564.

53. Orjuela P. S., da Silva N., da Silva M., Urbano F. M., 2009b. Recurrent Parasitemias and Population Dynamics of *Plasmodium vivax* Polymorphisms in Rural Amazonia. Department of Health Sciences, Federal University of Acre, Rio Branco, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 81: 961–968.
54. Organización Panamericana de la Salud. 2006. Plan estratégico regional contra la malaria en las Américas 2006-2010. Washington, D. C.
55. Ousmane A. K., Sango H. O., Maiga M. S., Mounkoro M., Sangare L., Keita N., Fane S., Mahamadou I., Traore K., Maiga A. S., Maaiga M. K., Diallo A., Krogstad D. J., 2005. Effect of Seasonality on the Prevalence of the Four Malaria Parasite Species In Northern Mali. Abstrat Book. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 54th Annual Meeting. 73(6): 283.
56. Perkins M. D., Bell D. R., 2008. Working without a blindfold: the critical role of diagnostic in malaria control. *Malaria Journal.* 7:S5.
57. Phillips E. J., Keystone J. S., Kain K. C., 1996. Failure of combined chloroquine and high-dose primaquine therapy for *Plasmodium vivax* malaria acquired in Guyana, South America. *Clin Infect Dis.* 23: 1171–1173.
58. Prajapati S. K., Joshi H., Valecha N., 2010. *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-3 $\alpha$ : a high-resolution marker for genetic diversity studies. *J Vector Borne Dis.* 47: 85–90.
59. Ratcliff A., Siswantoro H., Kenangalem E., Wuwung M., Brockman A., 2007 Therapeutic response of multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* to chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine in southern Papua, Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 101: 351–359.
60. Ribeiro R. S., Ladeira L., Rezende A. M., Fernandes C. J., Carvalho L. H., Ferreira C., 2011. Analysis of the genetic variability of PvMSP-3 $\alpha$  among *Plasmodium vivax* in Brazilian field isolates. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 6: 27-33.
61. Rodolfo H., De Donato M., Quijada I., Peña A. 2007. High prevalence of malaria infection in Amazonas state, Venezuela. *Rev Inst Med Trop.* 49: 79-85.

62. Roshanravan B., Kari E., Gilman R. H., Cabrera L., Lee E., Metcalfe J., Calderon M., Lescano A. G., Montenegro S. H., Calampa C., Vinetz J. M., 2003. Endemic malaria in the Peruvian Amazon region of Iquitos. *Am J Trop Med Hyg.* 69:45-52.
63. Sattabongkot J., Tsuboi T., Zollner G. E., Sirichaisinthop J., Cui L., 2004. *Plasmodium vivax* transmission: chances for control? *Trends Parasitol.* 20:192–198.
64. Sawyer D. 1993. Economic and Social Consequences of Malaria in New Colonization Projects in Brazil. *Soc Sci Med.* 37(9): 1131-1136.
65. Scopel K. K., Fontes C. J., Nunes A. C., Horta M. F., Braga E. M. 2004. Low sensitivity of nested PCR using *Plasmodium* DNA extracted from stained thick blood smears: an epidemiological retrospective study among subjects with low parasitaemia in an endemic area of the Brazilian Amazon region. *Malaria Journal.* 3:3-8.
66. Singh B., Bobogare A., Cox-Singh J., Snounou G., Abdullah M. S., Rahman H. A. 1999. A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *Am J Trop Med Hyg.* 60: 687-692.
67. Singh B., Lee K. S., Matusop A., Radhakrishnan A., Shamsul S. G., Cox-Singh J., Thomas A., Conway D., 2004. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet.* 363: 1017-1024.
68. Siripoon N., Snounou G., Yamogkul P., Na-Bangchang K., Thaithong S. 2002. Cryptic *Plasmodium falciparum* parasites in clinical *P. vivax* blood samples from Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 96:70-71.
69. Snounou G., Viriyakosol S., Jarra W., Thaithong S., Brown K. N. 1993. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol.* 58:283-292.
70. Sojo M. M., Cáceres J. L., Pizzo N. N., Rojas J., Maldonado A., Pulgar R. N., Campos E., Terán E., Pérez A., 2008. Malaria recurrente a *Plasmodium vivax*. Municipio Cajigal, Estado Sucre, Venezuela. *Rev Biomed.* p: 3-15.

71. Soto J., Toledo J., Gutierrez P., Luz M., Llinas N., Cedeño N., Dunne M., Berman J. 2001. *Plasmodium vivax* clinically resistant to chloroquine in Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 65: 90–93
72. Steenkeste N., Incardona S., Chy S., Duval L., Ekala M. T., Lim P., Hewitt S., Sochantha T., Socheat D., Rogier C., Mercereau-Puijalon O., Fnadeur T., Ariey F. 2009. Towards high-throughput molecular detection of *Plasmodium*: New approaches and molecular markers. *Malaria Journal.* 8:86
73. Sutton P. L., Neyra V., Hernandez J. N., Branch O. H., 2009. *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* Infections in the Peruvian Amazon: Propagation of Complex, Multiple Allele-Type Infections without Super-Infection. *Am J Trop Med Hyg.* 81(6): 950–960.
74. Suwanarusk R., Russell B., Chavchich M., Chalfein F., Kenangalem E., Kosaisavee V., Prasetyorini B., Piera K. A., Barends M., Tjitra E., Nosten F., Cheng Q., Price R. N., 2007. Chloroquine resistant *Plasmodium vivax*: in vitro characterization and association with molecular polymorphisms. *PLoS ONE.* 2:9.
75. Tangpukdee N., Duangdee C., Wilairatana P., Krudsood S. 2009. Malaria Diagnosis. A brief Review. *Korean J Parasitol.* 47:93-102.
76. Tjitra E., Baker J., Suprianto S., Cheng Q., Anstey N. M., 2002. Therapeutic efficacies of artesunate-sulfadoxine-pyrimethamine and chloroquine-sulfadoxinepyrimethamine in vivax malaria pilot studies: relationship to *Plasmodium vivax* dhfr mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 3947–3953.
77. Trenton K., Ruebush I., Zegarra J., Cairo J., Ellen M., Andersen, Green M., Dylan R. Pillai, Marquiño W., Huilca M., Arevalo E., Garcia C., Solary L., Kain K. C. 2003. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* malaria in Peru. U. S. Naval Medical Research Center Detachment, Lima, Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 69(5): 548–552.

78. Vargas J., Elgegren J., San Miguel A., Cardoso R. 2003. Malaria en una Población Urbano Marginal de Iquitos. *Revista Peruana de Epidemiología* 11(1).
79. Veron V., Legrand E., Yrinesi J., Volney B., Simon S., Carme B., 2009. Genetic diversity of msp3alpha and msp1\_b5 markers of *Plasmodium vivax* in French Guiana. *Malar J.* 8:40.
80. Volman S., Sabeti P. C., Harti D. L., Birren B., Lander E., Wirth D. F., 2005. A Haplotype Map For *Plasmodium falciparum*. Abstrat Book. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 54th Annual Meeting 73(6).
81. White N. J., 2008. *Plasmodium knowlesi*: The Fifth Human Malaria Parasite Medicine, Mahidol University, Bangkok-Thailand. *Clinical Infectious Diseases.* 46:172–3.
82. Wongsrichanalai C., Barcus M. J., Muth S., Sutamihardja A., Wernsdorfer W.H. 2007. A review of malaria diagnostic tools: microscopy and Rapid Diagnostic Test (RDT). *Am J Trop Med Hyg.* 77: 119-127.
83. World Health Organization 1991. Basic Malaria Microscopy. Geneva: WHO Press.
84. World Health Organization 2005. UNICEF World malaria report. Geneva: WHO Press.
85. World Health Organization 2006. Who guidelines for the treatment of malaria. Geneva: WHO Press.
86. World Health Organization 2007. Global Paludismo Programme. Field application of in vitro assays for the sensitivity of human paludismo parasites to antipaludismo drugs. Geneva: Who Press.
87. World Health Organization 2008. World malaria report. Geneva: WHO Press.
88. World Health Organization 2009. Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy. Geneva: WHO Press.
89. Zakeri S., Barjesteh H., Djadid N. D., 2006. Merozoite surface protein-3alpha is a reliable marker for population genetic analysis of *Plasmodium vivax*. *Malar J.* 5:53.16.

# XI. ANEXOS

Fig. A1. Mapa de riesgo de malaria por *P. vivax*, incidencia acumulada por 1000 habitantes, Loreto 2009

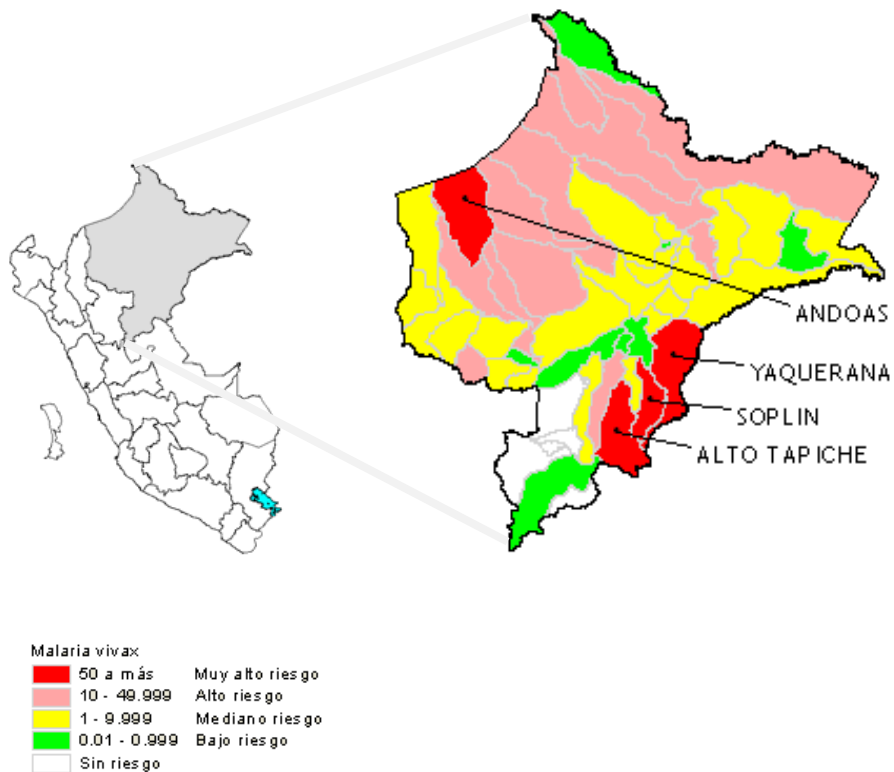
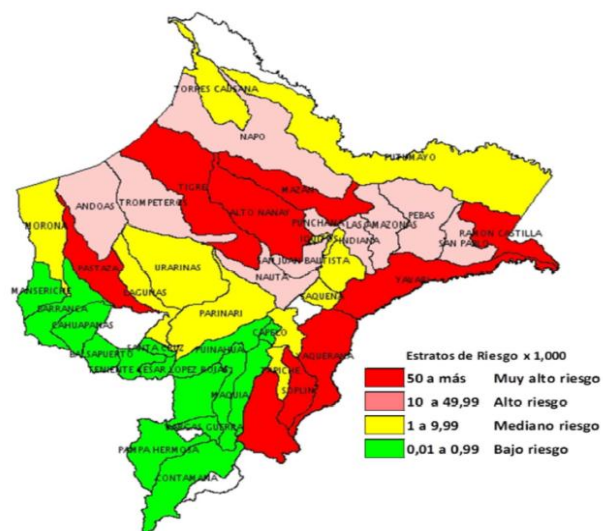


Fig. A2 .Mapa de riesgo de malaria del departamento de Loreto 2012



(\*) SE. 29 notificado hasta el 21/07/2012  
Fuente: Sistema Nacional de Vigilancia – DGE – MINSA.

Fig. A3 Ciclo Biológico de *Plasmodium vivax*

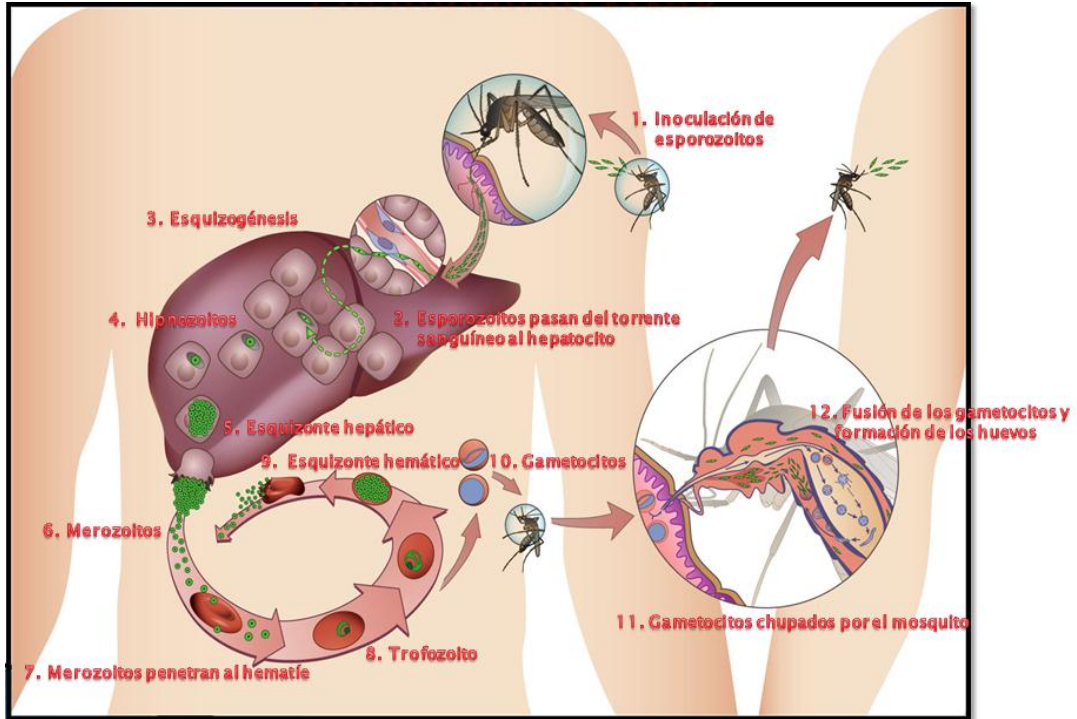


Fig. A4 Fase exo-eritrocítica de *Plasmodium vivax*

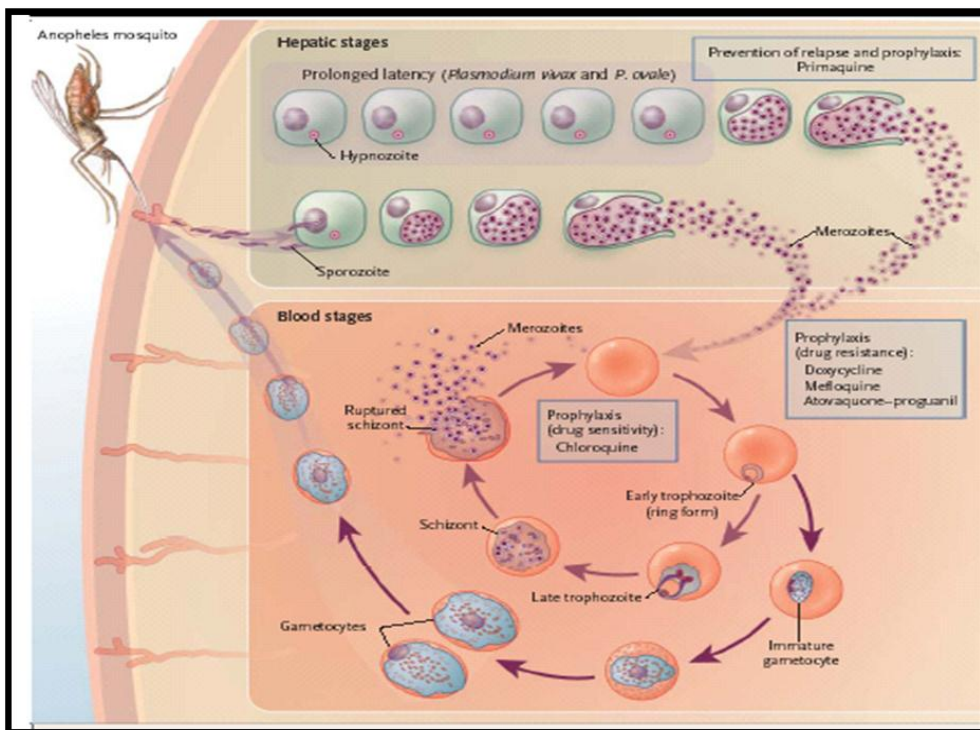


Tabla A1. Rango de frecuencias de los patrones enzimáticos durante la primera y segunda evaluación

| PATRÓN ENZIMÁTICO |              |             | PRIMERA EVALUACIÓN |   |      | SEGUNDA EVALUACIÓN |   |      |
|-------------------|--------------|-------------|--------------------|---|------|--------------------|---|------|
| <i>Hha I</i>      | <i>Alu I</i> | COMBINACIÓN | A                  | B | F%   | A                  | B | F%   |
| PH1               | PA2          | PHA1        | 12                 |   | 6.7  | 9                  |   | 5    |
| PH2               | PA1          | PHA2        | 24                 |   | 13.3 | 27                 |   | 15   |
| PH3               | PA6          | PHA3        | 12                 |   | 6.7  | 21                 |   | 11.7 |
| PH4               | PA2          | PHA4        | 25                 |   | 14   | 21                 |   | 11.7 |
| PH4               | PA3          | PHA5        | 1                  |   | 0.5  | 1                  |   | 0.5  |
| PH5               | PA2          | PHA6        | 35                 |   | 19.4 | 36                 |   | 20   |
| PH6               | PA3          | PHA7        | 6                  |   | 3.3  | 5                  |   | 2.9  |
| PH6               | PA7          | PHA8        | -                  |   | -    | 1                  |   | 0.5  |
| PH7               | PA3          | PHA9        | 9                  |   | 5    | 6                  |   | 3.3  |
| PH8               | PA2          | PHA10       | -                  |   | -    | 2                  |   | 1    |
| PH8               | PA7          | PHA11       | 5                  |   | 2.9  | 5                  |   | 2.9  |
| PH9               | PA4          | PHA12       | 8                  |   | 4.4  | 2                  |   | 1    |
| PH9               | PA5          | PHA13       | 25                 |   | 14   | 28                 |   | 16   |
| PH10              | PA7          | PHA14       | -                  | 8 | 4.4  | -                  | 9 | 5    |
| PH11              | PA2          | PHA15       | 3                  |   | 1.7  | 1                  |   | 0.5  |
| PH11              | PA4          | PHA16       | 4                  |   | 2.2  | -                  |   | -    |
| PH11              | PA8          | PHA17       | -                  |   | -    | 2                  |   | 1    |
| PH11              | PA6          | PHA18       | 1                  |   | 0.5  | 1                  |   | 0.5  |
| PH11              | PA7          | PHA19       | -                  |   | -    | 1                  |   | 0.5  |
| PH12              | PA1          | PHA20       | 1                  |   | 0.5  | -                  |   | -    |
| PH13              | PA7          | PHA21       | 1                  |   | 0.5  | 2                  |   | 1    |

Tabla A2. Distribución de los casos recurrentes con haplotipos monoclonales y policlonales

|                  |              | 2 DA EVALUACION |      |      |      |      |      |      |      |      |       |       |       |       |       |              |       |       |       |       |       |   |       |
|------------------|--------------|-----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|---|-------|
|                  |              | MONOCLONALES    |      |      |      |      |      |      |      |      |       |       |       |       |       | POLICLONALES |       |       |       |       |       |   |       |
|                  |              | PHA1            | PHA2 | PHA3 | PHA4 | PHA5 | PHA6 | PHA7 | PHA8 | PHA9 | PHA10 | PHA11 | PHA12 | PHA13 | PHA14 | PHA15        | PHA16 | PHA17 | PHA18 | PHA19 | PHA20 |   | PHA21 |
| 1 ERA EVALUACION | MONOCLONALES | PHA1            | 4    | 1    | 2    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 1            | 2     | 1     | 0     | 0     | 0     | 0 | 12    |
|                  |              | PHA2            | 0    | 13   | 4    | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 3            | 1     | 0     | 0     | 1     | 0     | 0 | 24    |
|                  |              | PHA3            | 0    | 1    | 7    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1     | 0     | 0     | 0     | 1     | 1            | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0 | 13    |
|                  |              | PHA4            | 2    | 4    | 0    | 8    | 0    | 2    | 1    | 0    | 1     | 1     | 0     | 1     | 3     | 0            | 1     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0 | 24    |
|                  |              | PHA5            | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0            | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0 | 1     |
|                  |              | PHA6            | 2    | 0    | 1    | 1    | 0    | 22   | 2    | 0    | 0     | 1     | 1     | 0     | 2     | 1            | 0     | 0     | 0     | 1     | 0     | 1 | 35    |
|                  |              | PHA7            | 0    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 0     | 0     | 0     | 1     | 0     | 0            | 0     | 1     | 0     | 0     | 0     | 0 | 6     |
|                  |              | PHA8            | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0            | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0 | 0     |
|                  |              | PHA9            | 0    | 0    | 0    | 3    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0     | 4     | 0     | 1     | 0     | 0            | 1     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0 | 9     |
|                  |              | PHA10           | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0            | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0 | 0     |
|                  |              | PHA11           | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0     | 0     | 2     | 0     | 1     | 0            | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0 | 5     |
|                  |              | PHA12           | 0    | 2    | 1    | 0    | 0    | 3    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 2     | 0            | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0 | 8     |
|                  |              | PHA13           | 0    | 5    | 1    | 2    | 0    | 5    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 10    | 1            | 0     | 0     | 0     | 1     | 0     | 0 | 25    |
|                  |              | PHA14           | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0     | 0     | 1     | 0     | 1     | 3            | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0 | 8     |
| POLICLONALES     | PHA15        | 1               | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0            | 0     | 0     | 0     | 0     | 3     |   |       |
|                  | PHA16        | 0               | 0    | 1    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0     | 0     | 2     | 0     | 0     | 0            | 0     | 0     | 0     | 0     | 4     |   |       |
|                  | PHA17        | 0               | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0            | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |   |       |
|                  | PHA18        | 0               | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0            | 0     | 0     | 0     | 0     | 1     |   |       |
|                  | PHA19        | 0               | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0            | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |   |       |
|                  | PHA20        | 0               | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0            | 0     | 0     | 0     | 0     | 1     |   |       |
|                  | PHA21        | 0               | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0            | 0     | 0     | 0     | 0     | 1     |   |       |



**Tabla A3. Mutaciones en el gen de resistencia *pvmdr1* de *P. vivax* presentes en aislados de la localidad de Mazán-Iquitos.**

| Aislado-Mazán       | MUTACIONES NO SINÓNIMAS |            |             |             | MUTACIÓN SINÓNIMA |
|---------------------|-------------------------|------------|-------------|-------------|-------------------|
| Haplotipo idéntico  | SNPs M958T              | SNPs Y976F | SNPs F1076L | SPNs E1125K | SNPs L1022L       |
| DTS 603             | M                       | F          | L           | E           | L                 |
| DTS 869             | M                       | F          | L           | E           | L                 |
| DTS 646             | M                       | F          | L           | E           | L                 |
| DTS 353             | M                       | F          | L           | E           | L                 |
| DTS 561             | T                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 782             | T                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 149             | T                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 362             | M                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 849             | M                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 310             | M                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 370             | M                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 749             | M                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 191             | M                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 288             | M                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 392             | M                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 888             | M                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 034             | M                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 234             | M                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 786             | M                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 396             | M                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 636             | M                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 771             | M                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 433             | M                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 479             | M                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 832             | M                       | Y          | F           | E           | L                 |
| Haplotipo diferente | SNPs M958T              | SNPs Y976F | SNPs F1076L | SPNs E1125K | SNPs L1022L       |
| DTS 544             | T                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 699             | T                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 555             | T                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 502             | T                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 826             | M                       | Y          | F           | K           | L                 |
| DTS 395             | M                       | Y          | F           | K           | L                 |
| DTS 072             | M                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 140             | M                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 427             | M                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 186             | M                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 803             | M                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 343             | M                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 221             | M                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 099             | M                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 796             | M                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 325             | M                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 125             | M                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 023             | M                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 421             | M                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 485             | M                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 747             | M                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 532             | M                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 689             | M                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 221             | M                       | Y          | F           | E           | L                 |
| DTS 941             | M                       | Y          | F           | E           | L                 |

Tabla A4. Valores de amplificación (Ct) de los fragmentos génicos *pvald1* y *pvmdr1* para determinar el número de copias del gen blanco, en las muestras de individuos con relapso.

| Sample Name | Target Name   | C <sub>T</sub> | T <sub>m1</sub> | Target Name   | C <sub>T</sub> | T <sub>m1</sub> | RQ        |
|-------------|---------------|----------------|-----------------|---------------|----------------|-----------------|-----------|
| LED         | <i>pvald1</i> | 29.2396        | 79.30217        | <i>pvmdr1</i> | 29.4139        | 77.809624       | 1         |
| Sample 1    |               | 23.9142        | 79.45104        |               | 24.4192        | 77.962288       | 0.7951443 |
| Sample 2    |               | 15.8389        | 79.30217        |               | 16.1807        | 77.962288       | 0.8903434 |
| Sample 3    |               | 24.6422        | 79.30217        |               | 25.3199        | 77.962288       | 0.7054419 |
| Sample 4    |               | 18.6828        | 79.59991        |               | 19.3295        | 77.962288       | 0.7207633 |
| Sample 5    |               | 31.6353        | 79.30217        |               | 32.9746        | 77.813416       | 0.445951  |
| Sample 6    |               | 21.4916        | 79.59991        |               | 22.003         | 77.962288       | 0.7916367 |
| Sample 7    |               | 25.1425        | 79.45104        |               | 25.8859        | 77.962288       | 0.6740463 |
| Sample 8    |               | 30.3658        | 79.45104        |               | 30.6902        | 77.962288       | 0.9011423 |
| Sample 9    |               | 23.7606        | 79.30032        |               | 23.61          | 77.960327       | 1.2525674 |
| Sample 10   |               | 17.2431        | 79.30032        |               | 17.523         | 77.960327       | 0.9294083 |
| Sample 11   |               | 19.4234        | 79.5981         |               | 19.6166        | 77.960327       | 0.9870059 |
| Sample 12   |               | 26.286         | 79.30032        |               | 26.3154        | 77.960327       | 1.1056682 |
| Sample 13   |               | 18.7262        | 79.30032        |               | 19.4946        | 77.960327       | 0.6624361 |
| Sample 14   |               | 20.9454        | 79.4492         |               | 21.5247        | 78.109207       | 0.7552239 |
| Sample 15   |               | 23.6405        | 79.4492         |               | 23.9314        | 77.960327       | 0.9223161 |
| Sample 16   |               | 21.8247        | 79.44488        |               | 22.3638        | 78.104759       | 0.7765665 |
| Sample 17   |               | 25.2147        | 79.44488        |               | 25.5966        | 77.955856       | 0.8659642 |
| Sample 18   |               | 26.7417        | 79.74268        |               | 26.9113        | 78.104759       | 1.0032589 |
| Sample 19   |               | 18.7338        | 79.44488        |               | 19.0024        | 78.104759       | 0.9367098 |
| Sample 20   |               | 18.141         | 79.44488        |               | 18.4383        | 78.104759       | 0.9182803 |
| Sample 21   |               | 24.3782        | 79.44488        |               | 24.6677        | 78.104759       | 0.9232311 |
| Sample 22   |               | 25.3648        | 79.44488        |               | 25.6167        | 78.104759       | 0.9476525 |
| Sample 23   |               | 28.8975        | 79.30696        |               | 29.7893        | 77.967361       | 0.6081348 |
| Sample 24   |               | 18.4218        | 79.44488        |               | 18.9024        | 78.104759       | 0.8083209 |
| Sample 25   | 20.7154       | 79.4492        | 20.8947         | 78.109207     | 0.9965403      |                 |           |
|             |               |                |                 |               | ∑              | 21.323754       |           |
|             |               |                |                 |               | Media          | 0.85            |           |
|             |               |                |                 |               | DS             | 0.16            |           |

Tabla A5. Valores de amplificación (Ct) de los fragmentos génicos *pvald1* y *pvmdr1* para determinar el número de copias del gen blanco, en las muestras de individuos con reinfección.

| Sample Name | Target Name   | C <sub>T</sub> | T <sub>m1</sub> | Target Name   | C <sub>T</sub> | T <sub>m1</sub> | RQ        |
|-------------|---------------|----------------|-----------------|---------------|----------------|-----------------|-----------|
| LED         | <i>pvald1</i> | 29.2396        | 79.30217        | <i>pvmdr1</i> | 29.4139        | 77.809624       | 1         |
| Sample 26   |               | 19.0215        | 79.4558         |               | 19.4617        | 78.116211       | 0.8317019 |
| Sample 27   |               | 20.6259        | 79.4558         |               | 21.0054        | 77.967361       | 0.8674011 |
| Sample 28   |               | 19.9124        | 79.30696        |               | 20.4473        | 77.967361       | 0.7788738 |
| Sample 29   |               | 22.4272        | 79.15812        |               | 22.5808        | 77.669678       | 1.0144331 |
| Sample 30   |               | 21.7057        | 79.4558         |               | 22.2015        | 78.116211       | 0.8002444 |
| Sample 31   |               | 20.3429        | 79.4558         |               | 20.8285        | 78.116211       | 0.8059662 |
| Sample 32   |               | 23.1732        | 79.3028         |               | 23.731         | 77.963173       | 0.7665527 |
| Sample 33   |               | 21.4429        | 79.3028         |               | 21.7931        | 77.963173       | 0.8852084 |
| Sample 34   |               | 22.7865        | 79.3028         |               | 23.3244        | 77.963173       | 0.7771879 |
| Sample 35   |               | 26.1737        | 79.3028         |               | 27.1666        | 77.814323       | 0.5670115 |
| Sample 36   |               | 18.9259        | 79.3028         |               | 19.4409        | 77.963173       | 0.789659  |
| Sample 37   |               | 15.8695        | 79.45164        |               | 16.3852        | 78.112022       | 0.7893073 |
| Sample 38   |               | 19.3259        | 79.14927        |               | 19.7252        | 77.809624       | 0.855553  |
| Sample 39   |               | 21.5252        | 79.14927        |               | 22.1813        | 77.809624       | 0.7160789 |
| Sample 40   |               | 15.8187        | 79.14927        |               | 16.5892        | 77.958473       | 0.6614857 |
| Sample 41   |               | 25.1425        | 79.45104        |               | 25.8859        | 77.962288       | 0.6740463 |
| Sample 42   |               | 30.3658        | 79.45104        |               | 30.6902        | 77.962288       | 0.9011423 |
| Sample 43   |               | 20.9454        | 79.4492         |               | 21.5247        | 78.109207       | 0.7552239 |
| Sample 44   |               | 23.6405        | 79.4492         |               | 23.9314        | 77.960327       | 0.9223161 |
| Sample 45   |               | 18.141         | 79.44488        |               | 18.4383        | 78.104759       | 0.9182803 |
| Sample 46   |               | 19.9124        | 79.30696        |               | 20.4473        | 77.967361       | 0.7788738 |
| Sample 47   |               | 22.8592        | 79.15812        |               | 22.9808        | 77.769678       | 1.0374199 |
| Sample 48   |               | 26.1737        | 79.3028         |               | 27.1666        | 77.814323       | 0.5670115 |
| Sample 49   |               | 19.9769        | 79.3028         |               | 20.4521        | 77.963173       | 0.8111272 |
| Sample 50   |               | 16.7495        | 79.45164        |               | 16.9752        | 78.112022       | 0.9645982 |
|             |               |                |                 |               | Σ              | 20.236705       |           |
|             |               |                |                 |               | Media          | 0.81            |           |
|             |               |                |                 |               | DS             | 0.11            |           |

Tabla A6. Código Genético, tripletes de nucleótidos codificantes de aminoácidos

|   |   | Second Position of Codon |             |                      |                      |   |   |
|---|---|--------------------------|-------------|----------------------|----------------------|---|---|
|   |   | T                        | C           | A                    | G                    |   |   |
| F<br>i<br>r<br>s<br>t<br><br>P<br>o<br>s<br>i<br>t<br>i<br>o<br>n | T | TTT Phe [F]              | TCT Ser [S] | TAT Tyr [Y]          | TGT Cys [C]          | T | T<br>h<br>i<br>r<br>d<br><br>P<br>o<br>s<br>i<br>t<br>i<br>o<br>n |
|   |   | TTC Phe [F]              | TCC Ser [S] | TAC Tyr [Y]          | TGC Cys [C]          | C |   |
|   |   | TTA Leu [L]              | TCA Ser [S] | TAA <i>Ter</i> [end] | TGA <i>Ter</i> [end] | A |   |
|   |   | TTG Leu [L]              | TCG Ser [S] | TAG <i>Ter</i> [end] | TGG Trp [W]          | G |   |
|   | C | CTT Leu [L]              | CCT Pro [P] | CAT His [H]          | CGT Arg [R]          | T |   |
|   |   | CTC Leu [L]              | CCC Pro [P] | CAC His [H]          | CGC Arg [R]          | C |   |
|   |   | CTA Leu [L]              | CCA Pro [P] | CAA Gln [Q]          | CGA Arg [R]          | A |   |
|   |   | CTG Leu [L]              | CCG Pro [P] | CAG Gln [Q]          | CGG Arg [R]          | G |   |
|   | A | ATT Ile [I]              | ACT Thr [T] | AAT Asn [N]          | AGT Ser [S]          | T |   |
|   |   | ATC Ile [I]              | ACC Thr [T] | AAC Asn [N]          | AGC Ser [S]          | C |   |
|   |   | ATA Ile [I]              | ACA Thr [T] | AAA Lys [K]          | AGA Arg [R]          | A |   |
|   |   | ATG Met [M]              | ACG Thr [T] | AAG Lys [K]          | AGG Arg [R]          | G |   |
|   | G | GTT Val [V]              | GCT Ala [A] | GAT Asp [D]          | GGT Gly [G]          | T |   |
|   |   | GTC Val [V]              | GCC Ala [A] | GAC Asp [D]          | GGC Gly [G]          | C |   |
|   |   | GTA Val [V]              | GCA Ala [A] | GAA Glu [E]          | GGA Gly [G]          | A |   |
|   |   | GTG Val [V]              | GCG Ala [A] | GAG Glu [E]          | GGG Gly [G]          | G |   |

## Formato A1: Consentimiento Informado de Participación de Adultos

### CONSENTIMIENTO INFORMADO DE PARTICIPACIÓN-ADULTOS

#### Título del Proyecto de Investigación:

#### Genotipificación de *Plasmodium vivax* en la Amazonía Peruana (Reservorios Humanos para la Transmisión de Malaria por *Plasmodium vivax* en la amazonía Peruana)

Investigador principal: Dr. Joseph Vinetz. Co-Investigadores: Dr. Raul Chuquiyaui, Dr. Robert H. Gilman, Dra. Margaret Koset, Dra. Maritza Calderón

#### Propósito del Estudio:

Este es un estudio conducido por la Universidad Peruana Cayetano Heredia, la Universidad de California en San Diego y el Instituto de Medicina Tropical "Alexander von Humboldt"; y en colaboración con el Ministerio de Salud a través de la Dirección Regional de Salud de Loreto.

El objetivo es conocer los perfiles genéticos del *Plasmodium vivax* causante de malaria y determinar la forma en que se transmite en las zonas de estudio.

Como usted sabe la malaria es una enfermedad muy frecuente en nuestra Amazonia, con importantes trastornos entre las personas que la padecen. Hay dos especies de parásito que causan malaria en Perú: *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum*. Se está haciendo un gran esfuerzo para luchar contra ella. Estos esfuerzos en el diagnóstico y prevención requieren de la participación directa de las personas como usted.

Usted está siendo invitado a tomar parte en este estudio porque su gota gruesa es positiva para *Plasmodium vivax*. Su participación en este estudio depende completamente de usted.

#### Procedimientos:

Si usted acepta participar en el estudio, un trabajador de salud realizará lo siguiente:

- Le hará preguntas básicas sobre usted, su trabajo, su casa y su historial médico y síntomas.
- Se tomará una muestra de sangre de 10 ml.

#### Exclusiones:

Si usted tiene alguna de las siguientes condiciones no podrá participar en este estudio:

- Uso de antibióticos al momento o una semana antes de ingresar al estudio.
- Estar recibiendo tratamiento antimalárico ahora o en la última semana.
- No haber firmado el consentimiento informado.
- Tener malaria por *Plasmodium falciparum* o malaria mixta.
- Tener menos de 5 años de edad.

#### Riesgos e Incomodidades:

Su participación en el estudio conlleva un riesgo mínimo. La toma de sangre puede ocasionarle cierta incomodidad. Existe un mínimo riesgo de que aparezca un moretón después de la toma de sangre. Nosotros trataremos de mantener este riesgo tan bajo como sea posible. Este procedimiento se realizará con material estéril. Si decide participar, necesitaremos unos minutos para completar todo el proceso.

**Beneficios:**

Tomando parte en este estudio, ayudará a los médicos a conocer más sobre la malaria en nuestra Amazonia. El beneficio también será para su comunidad, ya que los médicos conocerán mejor sobre como se transmite la malaria en su comunidad y se podrán diseñar mejores técnicas de control. Los análisis de la sangre son completamente gratuitos para usted. Un personal de salud le visitara después de iniciado el tratamiento, de esta manera su condición de salud será estrechamente evaluada.

**Confidencialidad:**

Protegemos su confidencialidad. Sus respuestas, resultados y otra información que nos provea, tendrán un código en lugar de su nombre. Guardaremos toda la información bajo llave en nuestro laboratorio de la calle Morona 448, Iquitos, y sólo personal del estudio tendrá acceso. La información que lo identifique no será publicada con los resultados.

Nosotros nos reservamos el privilegio, de en el futuro, hacer otras pruebas para otros estudios sobre infecciones en las muestras obtenidas pero su nombre no será relacionado con la muestra.

**Voluntad a participar:**

La participación es voluntaria. En el caso de que usted decida participar, tiene opción de retirarse en cualquier momento si así lo desea, sin que esto afecte la atención médica que usted recibe.

**Preguntas acerca de este estudio:**

Este formato de consentimiento explica el objetivo del estudio. Por favor léalo con mucho cuidado antes de firmarlo. Puede hacer las preguntas que desee sobre lo que no entienda. Si no tiene preguntas ahora, siempre puede hacerlas en el futuro. Durante este estudio, va a ser informado sobre toda nueva información que pueda afectar a su salud. Si tiene alguna pregunta, o si quiere hablar con alguien porque siente que usted ha sido maltratado, o siente que participar en el estudio ha afectado su salud, por favor comuníquese por teléfono con el Dr. Joseph Vinetz (investigador principal, 065-242226) o al Dr. Raúl Chuquiyauri (coordinador, 065-9610846).

Si firma abajo significa que desea participar.

|                                 |                               |
|---------------------------------|-------------------------------|
| Nombre y firma del participante | Loreto, ____ de _____ del 200 |
| Nombre y firma del testigo      | Loreto, ____ de _____ del 200 |
| Firma del testigo               | Loreto, ____ de _____ del 200 |

## CONSENTIMIENTO INFORMADO DE PARTICIPACIÓN-MENORES

### Título del Proyecto de Investigación:

### Genotipificación de *Plasmodium vivax* en la Amazonía Peruana (Reservorios Humanos para la Transmisión de Malaria por *Plasmodium vivax* en la amazonía Peruana)

Investigador principal: Dr. Joseph Vinetz. Co-Investigadores: Dr. Raul Chuquiyaui, Dr. Robert H. Gilman, Dra. Margaret Koset, Dra. Maritza Calderón

#### **Propósito del Estudio:**

Este es un estudio conducido por la Universidad Peruana Cayetano Heredia, la Universidad de California San Diego y EL Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt; y en colaboración con el Ministerio de Salud a través de la Dirección Regional de Salud de Loreto.

La malaria es una enfermedad muy frecuente en nuestras comunidades, afectando a niños y adultos, con importantes trastornos entre las personas que la padecen. Hay dos especies de parásito que causan malaria en Perú: *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum*. Desde hace muchos años numerosas instituciones estamos haciendo un gran esfuerzo para luchar contra ella. Estos esfuerzos en el diagnóstico, cuidado de enfermos y prevención requieren la participación directa de las personas afectadas como usted.

Usted esta siendo invitado a tomar parte en este estudio porque su gota gruesa es positiva para *Plasmodium vivax*. Su participación en este estudio depende completamente de ustedes.

#### **Procedimientos:**

Si usted esta de acuerdo que su hijo participe, un trabajador de salud realizará lo siguiente:

- Le hará preguntas básicas sobre su casa, historial médico y síntomas de su hijo.
- Se le tomara a su hijo una muestra de sangre de 05 ml.

#### **Exclusiones:**

Si su hijo tiene alguna de las siguientes condiciones no podrá participar en este estudio:

- Uso de antibióticos al momento o una semana antes de ingresar al estudio.
- Estar recibiendo tratamiento antimalárico ahora o en la última semana.
- No haber firmado el consentimiento informado.
- Tener malaria por *Plasmodium falciparum* o malaria mixta.
- Tener menos de 5 años de edad.

#### **Riesgos e Incomodidades:**

La participación en el estudio conlleva un riesgo mínimo. La toma de sangre puede ocasionarle cierta incomodidad. Existe un mínimo riesgo de que aparezca un moretón después de la toma de sangre. Nosotros trataremos de mantener este riesgo tan bajo como sea posible. El procedimiento se realizará con material estéril. Necesitaremos unos minutos de su tiempo.

#### **Beneficios:**

Con su participación ayudará a los médicos a conocer más sobre la malaria en nuestra Amazonia. Los análisis de la sangre de su hijo son completamente gratuitos. Un personal de salud le visitará después de iniciado el tratamiento, de esta manera la condición de salud de su hijo será estrechamente evaluada.

**Confidencialidad:**

Nosotros protegemos su confidencialidad y la de su hijo dentro de los estándares establecidos. Sus respuestas, resultados de pruebas, y otra información que nos provea, serán identificados con un código en lugar de su nombre. Guardaremos toda la información del estudio bajo llave en nuestras oficinas en la calle Morona 448, y sólo el personal del estudio tendrá acceso a la información, a menos que nos dé su permiso. Su nombre, el de su hijo y otra información que lo identifique no serán publicados.

Nosotros nos reservamos el privilegio, de en el futuro, hacer otras pruebas para otros estudios sobre infecciones en las muestras obtenidas pero su nombre o el de su hijo no serán relacionados con la muestra.

**Voluntad a participar:**

La participación es voluntaria. En el caso de que usted decida hacer participar a su hijo, tiene la opción de retirarlo del estudio en cualquier momento si así lo desea, sin que esto afecte a la calidad o atención médica que usted o su hijo recibe.

**Preguntas acerca de este estudio:**

Este formato de consentimiento explica el objetivo del estudio. Por favor léalo con cuidado antes de firmarlo. Puede hacer preguntas sobre lo que no entienda. Si no tiene preguntas ahora, siempre puede hacerlas en el futuro. Durante el estudio, va a ser informado sobre toda nueva información que pueda afectar la salud de su hijo. Si tiene alguna pregunta, o siente que su hijo ha sido maltratado, o siente que participar en el estudio ha afectado su salud, por favor comuníquese por teléfono con el Dr. Joseph Vinetz (investigador principal – 065-242226) o al Dr. Raúl Chuquiyauri (coordinador – 065-9610846).

Si Usted firma abajo significa que desea hacer participar a su hijo.

|  |                                |
|--|--------------------------------|
| Nombre y firma del padre o tutor responsable | Iquitos, ____ de _____ del 200 |
| Nombre del niño y fecha de nacimiento        | Iquitos, ____ de _____ del 200 |
| Nombre y Firma del testigo                   | Iquitos, ____ de _____ del 200 |
| Firma y nombre del investigador responsable  | Iquitos, ____ de _____ del 200 |