



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**



**Caracterización molecular de *Plasmodium falciparum* asociada a
resistencia de antimaláricos en comunidades del distrito Río Santiago,
Condorcanqui, Amazonas 2022**

TESIS

**Para optar el Título Profesional de Licenciado en
Biología – Microbiología – Parasitología**

PRESENTADO POR:

Bach. Julio César Sandoval Bances

ASESOR:

MSc. Roberto Ventura Flores

CO-ASESORA:

PhD. Stella Maris Chenet Carrasco

LAMBAYEQUE, PERÚ

2024

**Caracterización molecular de *Plasmodium falciparum* asociada a
resistencia de antimaláricos en comunidades del distrito Río Santiago,
Condorcanqui, Amazonas 2022.**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciado en
Biología – Microbiología – Parasitología

APROBADA POR

Dra. Vásquez del Castillo, Ana María del Socorro



PRESIDENTA

Dr. Rodríguez Delfín, Luis Alberto



SECRETARIO

Mblga. Silva García, María Teresa



VOCAL

MSc. Ventura Flores, Roberto



ASESOR

PhD. Chenet Carrasco Stella Maris



CO-ASESORA

LAMBAYEQUE, PERÚ

2024

Caracterización molecular de Plasmodium falciparum asociada a resistencia de antimaláricos en comunidades del distrito Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022.

ORIGINALITY REPORT

14%

SIMILARITY INDEX

14%

INTERNET SOURCES

9%

PUBLICATIONS

4%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	revistabiomedica.org Internet Source	3%
2	hdl.handle.net Internet Source	1%
3	patents.google.com Internet Source	1%
4	Ana M. Montalvo, Jorge Fraga, Ivón Montano, Lianet Monzote, Gert Van der Auwera, Marcel Marín, Carlos Muskus. "Identificación molecular de aislamientos clínicos de Leishmania spp. procedentes de Colombia con base en el gen hsp70", Biomédica, 2016 Publication	1%
5	1library.co Internet Source	1%
6	idoc.pub Internet Source	1%



MSc. Roberto Ventura Flores
ASESOR

7	Submitted to Universidad Peruana Cayetano Heredia Student Paper	1 %
8	Ton Duc Thang University Publication	<1 %
9	umexpert.um.edu.my Internet Source	<1 %
10	rpmesp.ins.gob.pe Internet Source	<1 %
11	www.ncbi.nlm.nih.gov Internet Source	<1 %
12	bibliotecadigital.udea.edu.co Internet Source	<1 %
13	cybertesis.unmsm.edu.pe Internet Source	<1 %
14	scielo.conicyt.cl Internet Source	<1 %
15	www.frontiersin.org Internet Source	<1 %
16	tel.archives-ouvertes.fr Internet Source	<1 %
17	bdigital.unal.edu.co Internet Source	<1 %
18	Submitted to Sheffield Hallam University	



MSc. Roberto Ventura Flores
ASESOR

Student Paper

<1 %

19 Submitted to Universidad Catolica de Avila
Student Paper

<1 %

20 eprints.qut.edu.au
Internet Source

<1 %

21 Submitted to Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo
Student Paper

<1 %

22 repodigital.unrc.edu.ar
Internet Source

<1 %

23 Erika L. Flannery, Tina Wang, Ali Akbari, Victoria C. Corey et al. " Next-Generation Sequencing of Patient Samples Shows Evidence of Direct Evolution in Drug-Resistance Genes ", ACS Infectious Diseases, 2015
Publication

<1 %

24 doczz.es
Internet Source

<1 %

25 issuu.com
Internet Source

<1 %

26 www.coursehero.com
Internet Source

<1 %

27 pesquisa.bvsalud.org
Internet Source



MSc. Roberto Ventura Flores
ASESOR

		<1 %
28	Aditi Arya, Loick P. Kojom Foko, Shewta Chaudhry, Amit Sharma, Vineeta Singh. "Artemisinin-based combination therapy (ACT) and drug resistance molecular markers: A systematic review of clinical studies from two malaria endemic regions – India and sub-Saharan Africa", International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance, 2021 Publication	<1 %
29	docplayer.es Internet Source	<1 %
30	Klassert, Tilman E.. "Expresion y regulacion De Las Taquicininas En celulas Del Sistema Inmune: implicacion En El Inicio y/o progresion Del Asma", Universidad de La Laguna (Canary Islands, Spain), 2022 Publication	<1 %
31	repositorio.ucv.edu.pe Internet Source	<1 %
32	sigrid.cenepred.gob.pe Internet Source	<1 %
33	virtual.urbe.edu Internet Source	<1 %



MSc. Roberto Ventura Flores
ASESOR

34	Submitted to Universidad San Francisco de Quito Student Paper	<1 %
35	kupdf.net Internet Source	<1 %
36	www.repositorio.ufal.br Internet Source	<1 %
37	Badiola Benito, Nahuai. "Estudio de los mecanismos moleculares implicados en la muerte apoptótica en un modelo de isquemia in vitro", Bellaterra : Universitat Autònoma de Barcelona,, 2009 Internet Source	<1 %
38	Comabella López, Manuel, Universitat Autònoma de Barcelona. Departament de Medicina. "Búsqueda de biomarcadores asociados con la respuesta al tratamiento con interferón-beta en pacientes con esclerosis múltiple remitente-recurrente", Bellaterra : Universitat Autònoma de Barcelona,, 2014 Internet Source	<1 %
39	journals.plos.org Internet Source	<1 %
40	lookformedical.com Internet Source	<1 %
41	www.mdpi.com Internet Source	



MSc. Roberto Ventura Flores
ASESOR

		<1 %
42	Ferro, Daniela Damasceno Xavier(Boiteux, Leonardo Silva). "Estudos com o locus Ty-1 do tomateiro e busca por novos marcadores moleculares para tolerância ao Tomato severe rugose virus", RIUnB, 2013. Publication	<1 %
43	Submitted to UNIV DE LAS AMERICAS Student Paper	<1 %
44	repositorio.ufsm.br Internet Source	<1 %
45	H. Benchikhi, S. Chiheb. "Tuberculosis cutánea", EMC - Dermatología, 2015 Publication	<1 %
46	K. Sánchez-Herrera, H. Sandoval, D. Mouniee, N. Ramírez-Durán et al. "Molecular identification of Nocardia species using the sod A gene", New Microbes and New Infections, 2017 Publication	<1 %
47	Zhaoqing Yang. "Molecular analysis of chloroquine resistance in Plasmodium falciparum in Yunnan Province, China : Chloroquine resistance in Plasmodium falciparum", Tropical Medicine & International Health, 06/30/2007	<1 %



MSc. Roberto Ventura Flores
ASESOR

Publication		
48	documents.mx Internet Source	<1 %
49	ouci.dntb.gov.ua Internet Source	<1 %
50	www.researchgate.net Internet Source	<1 %
51	www.wma.net Internet Source	<1 %
52	Julio Sandoval-Bances, Milagros Saavedra-Samillán, Sonia Huyhua-Gutiérrez, Luis M. Rojas et al. "Caracterización molecular del dominio de la hélice del gen k13 de Plasmodium falciparum en muestras de comunidades nativas de Condorcanqui, Amazonas, Perú", Biomédica, 2023 Publication	<1 %
53	Sabin S. Nundu, Richard Culleton, Shirley V. Simpson, Hiroaki Arima et al. "Identification of polymorphisms in genes associated with drug resistance in Plasmodium falciparum isolates from school-age children in Kinshasa, Democratic Republic of Congo", Parasitology International, 2022 Publication	<1 %
54	Geletta Tadele, Aminata Jawara, Mary Oboh, Eniyou Oriero, Sisay Dugassa, Alfred	<1 %



MSc. Roberto Ventura Flores
ASESOR

Amambua-Ngwa, Lemu Golassa. "Clinical isolates of uncomplicated falciparum malaria from high and low malaria transmission areas show distinct pfcr1 and pfmdr1 polymorphisms in western Ethiopia", Research Square Platform LLC, 2022
Publication

-
- 55 Gustavo Adolfo Fontecha, Alejandra Pinto, Osman Archaga, Sergio Betancourth et al. <1%
"Assessment of Plasmodium Falciparum Antimalarial Drug Resistance Markers in pfcr1 and pfmdr1 Genes in Isolates from Honduras and Nicaragua, 2018-2021", Research Square Platform LLC, 2021
Publication
-

Exclude quotes Off
Exclude bibliography Off

Exclude matches Off



.....
MSc. Roberto Ventura Flores
ASESOR



Digital Receipt

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author: Julio Cesar Sandoval Bances
Assignment title: Quick Submit
Submission title: Caracterización molecular de Plasmodium falciparum asocia...
File name: n_Levantamiento_de_Observaciones_-_JULIO_SANDOVAL_ene...
File size: 1.95M
Page count: 62
Word count: 13,099
Character count: 67,389
Submission date: 04-Jan-2024 05:02PM (UTC-0500)
Submission ID: 2266817043



MSc. Roberto Ventura Flores
ASESOR



ACTA DE SUSTENTACIÓN
ACTA DE SUSTENTACION N° 008-2024-FCCBB-UI

Siendo las 15:30 horas del día 25 de enero de 2024, se reunieron los Miembros del Jurado evaluador de la tesis titulada **"Caracterización molecular de *Plasmodium falciparum* asociada a resistencia de antimaláricos en comunidades del distrito Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022"** con la finalidad de evaluar y calificar la sustentación de la tesis antes mencionada, conformada por los siguientes docentes:

Dra. Ana Maria del Socorro Vásquez de Cumpa	Presidenta
Dr. Luis Alberto Rodríguez Delfín	Secretario
Mbga. Maria Teresa Silva García	Vocal
MSc. Roberto Ventura Flores	Asesor

Acto de sustentación fue autorizado por Resolución N° 019-2024-FCCBB/D, de fecha 23 de enero de 2024.

La Tesis presentada y sustentada por el Bachiller **JULIO CÉSAR SANDOVAL BANCES** tuvo una duración de 30... minutos. Después de la sustentación y absueltas las preguntas y observaciones de los miembros del jurado; se procedió a la calificación respectiva, otorgándole el calificativo de (*14*) *6.000* (*19.0*) en la escala vigesimal.

Por lo que el Bachiller **JULIO CÉSAR SANDOVAL BANCES** queda **APTO** para obtener el título profesional de Licenciado en Biología – Microbiología – Parasitología de acuerdo con la Ley Universitaria 30220 y la normatividad vigente de la Facultad de Ciencias Biológicas y la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

Siendo las *17:00* se dio por concluido el presente acto académico, dándose conformidad al presente acto, con la firma de los miembros del jurado.

Firman:

Dra. Ana Maria del Socorro Vásquez de Cumpa,
Presidenta

Dr. Luis Alberto Rodríguez Delfín
Secretario

Mbga. Maria Teresa Silva García,
Vocal

MSc. Roberto Ventura Flores
Asesor

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE ORIGINALIDAD DE TESIS

Yo, Roberto Ventura Flores, Asesor de la Tesis, del bachiller: Julio César Sandoval Bances

Titulada: Caracterización molecular de *Plasmodium falciparum* asociada a resistencia de antimaláricos en comunidades del distrito Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022, luego de la revisión exhaustiva del documento doy fe que la misma tiene un índice de similitud de 14% verificable en el reporte de similitud del programa Turnitin.

El suscrito analizó dicho reporte y concluyó que solo el 14% coincide con otras fuentes bibliográficas por lo que la tesis cumple con lo establecido por la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

Lambayeque, 04 de enero del 2024.



MSc. Roberto Ventura Flores
ASESOR

AGRADECIMIENTOS

En este presente trabajo quiero agradecer a Dios por cada momento y haberme guiado en cada etapa de mi vida.

A mis padres, les agradezco infinitamente por su constante apoyo, por su fuerza, lucha y sacrificio, que me han brindado para ser mejor cada día, y mi inspiración en los días más difíciles y mi mayor motivo para seguir adelante.

Al Instituto de Enfermedades Tropicales de la UNTRM, por haberme aceptado ejecutar mi tesis en sus instalaciones y por permitir seguir creciendo profesionalmente, sobre todo, a la Dra. Stella Chenet y al Dr. Rafael Tapia por su apoyo en todo momento, en sus consejos, en sus conocimientos y su asesoramiento durante el desarrollo del presente trabajo.

Al MSc. Roberto Ventura Flores, por su apoyo y asesoramiento y brindarme las herramientas necesarias y ser guía para el presente trabajo.

A mis compañeros del Instituto de Enfermedades Tropicales, por desearme siempre lo mejor y motivarme cada día durante el desarrollo de la investigación.

A Milagros Saavedra, por su apoyo constante en este proceso y por sus palabras de motivación.

A mis maestros, por contribuir en mi carrera universitaria, por sus enseñanzas, sus consejos brindados en mi vida académica y más que eso por guiarme para ser una mejor persona y profesional.

DEDICATORIAS

A DIOS, por ser mi guía, por su inmensa bondad, que me acompaña y me da fuerzas todos los días.

A MIS PADRES:

A mi papá, Uvercio por su apoyo mutuo, por ser parte de mi vida profesional y a mi madre Margarita que, desde el cielo, sé que día a día me está bendiciendo y dándome fortaleza para seguir cumpliendo con cada uno de mis sueños.

A MIS HERMANOS:

Pilar, Ricardo y Bernardino, les agradezco sinceramente por su apoyo infinito, por confiar en mis capacidades y sobre todo dándome ánimos para culminar con este logro. Cada uno de ustedes ha contribuido para hacer realidad este éxito. Los quiero profundamente y mi afecto hacia ustedes es profundo.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	iii
I. INTRODUCCIÓN.....	12
II. MARCO TEÓRICO.....	15
1. ANTECEDENTES	15
2. BASES TEÓRICAS	21
III. MÉTODOS Y MATERIALES.....	26
1. Tipo y diseño de investigación	26
2. Población y Muestra	26
3. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	26
3.1. Técnicas	26
3.2. Instrumentos de recolección de datos.....	26
3.3. Procedimiento.....	26
3.3.1.Extracción de ADN de sangre en papel filtro y sangre total	28
3.3.2.Identificación molecular de <i>Plasmodium</i> spp.....	28
3.3.3.Amplificación del ADN y generación de productos	29
3.3.4.PCR para la amplificación del gen <i>Pfk13</i>	30
3.3.5.PCR para la amplificación del gen <i>Pfcrt</i>	31
3.3.6.PCR para la amplificación del gen <i>Pfdhps</i>	32
3.3.7.PCR para la amplificación del gen <i>Pfdhfr</i>	32
3.3.8.PCR para la amplificación del gen <i>Pfmdr1</i>	32
3.3.9.Electroforesis.....	33
3.3.9.1. Preparación del gel de agarosa.....	33
3.3.9.2. Carga de los productos obtenidos de la PCR en el gel de agarosa	34
3.3.9.3. Visualización del gel.....	34
3.3.10. Purificación del amplicón	35
3.3.11. Secuenciamiento Sanger por electroforesis capilar del ADN de los genes <i>Pfk13</i> , <i>Pfcrt</i> , <i>Pfdhfr</i> , <i>Pfdhps</i> y <i>Pfmdr1</i>	35
4. Aspectos éticos	36
5. Análisis y procesamientos de datos	36
IV. RESULTADOS.....	37
1. Caracterización epidemiológica y molecular de <i>Plasmodium falciparum</i>	37

2. Amplificación y visualización de <i>Pfk13</i> , <i>Pfcrt</i> , <i>Pfdhfr</i> , <i>Pfdhps</i> y <i>Pfmdr1</i> de <i>P. falciparum</i> por PCR anidada y convencional.....	40
3. Secuenciamiento por Sanger de genes asociados a resistencia en <i>P. falciparum</i> : <i>Pfk13</i> , <i>Pfcrt</i> , <i>Pfdhfr</i> , <i>Pfdhps</i> y <i>Pfmdr1</i>	42
a. Identificación de mutaciones mediante el análisis de secuenciación de ADN en el gen <i>PfK13</i>	42
b. Identificación de mutaciones mediante el análisis de secuenciación de ADN en el gen <i>Pfcrt</i>	45
c. Identificación de mutaciones mediante el análisis de secuenciación de ADN en el gen <i>Pfdhfr</i> y <i>Pfdhps</i>	48
d. Identificación de mutaciones por secuenciamiento de ADN del gen <i>Pfmdr1</i>	52
V. DISCUSIÓN.....	54
VI. CONCLUSIÓN.....	59
VII. RECOMENDACIONES	60
VIII. REFERENCIAS	61
IX. ANEXOS	78

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Perfil de mutaciones moleculares en los genes *Pfdhfr*, *Pfdhps*, *Pfmdr1*, *Pfcrt* y *Pfk13* de *Plasmodium falciparum* relacionadas con la resistencia a diferentes fármacos antipalúdicos.

Tabla 2. Condiciones del master mix para la determinación de especies de *Plasmodium*, mediante la PCR en tiempo real, empleados en las muestras provenientes de las comunidades del distrito Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022

Tabla 3. Marcadores, Partidores y secuencias de amplicones empleados. por PCR anidado y PCR convencional, para *P. falciparum*.

Tabla 4. Características de las muestras positivos de *P. falciparum* (n=30) en el distrito del Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022

Tabla 5. Identificación de *P. falciparum* por microscopía y PCR tiempo real en comunidades del río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022.

Tabla 6. Ausencia de mutaciones del gen K13 de *P. falciparum* asociado con resistencia a artemisinina de comunidades del distrito Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022.

Tabla 7. Mutaciones en el gen *Pfcrt*, asociados con resistencia a cloroquina de *P. falciparum* de comunidades de Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022.

Tabla 8. Mutaciones en el gen *Pfdhps* y *Pfdhfr* de *P. falciparum* asociados con resistencia a sulfadoxina y pirimetamina de comunidades del distrito Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas durante 2022.

Tabla 9. Mutaciones del gen *Pfmdr1* de *P. falciparum* asociado a resistencia de mefloquina y cloroquina en comunidades del Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022.

Tabla 10. Genotipos circulantes de *P. falciparum* asociada a resistencia a los antimaláricos en muestras de comunidades del distrito Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Curvas de amplificación y valores de Ct por PCR en tiempo real, se muestra la identificación de *P. falciparum* en comunidades del distrito Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022.

Figura 2. Electroforesis de la amplificación por PCR de los genes *Pfk13*, *Pfcrt*, *Pfdhfr*, *Pfdhps* y *Pfmdr1* de *P. falciparum* de comunidades del Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022.

Figura 3. Alineamiento múltiple de secuencias de nucleótidos del gen *Pfk13* de *P. falciparum* en estado salvaje de comunidades de Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022.

Figura 4. Alineamiento múltiple de secuencias de nucleótidos del gen *Pfk13* de *P. falciparum* en estado salvaje de comunidades de Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022.

Figura 5. Alineamiento múltiple de secuencias de nucleótidos y aminoácidos del gen *Pfcrt* indicando mutaciones en los codones 72S y 76T de *P. falciparum* de comunidades del distrito Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022.

Figura 6. Alineamiento múltiple de secuencias del gen *Pfdhfr* de *P. falciparum* con mutaciones en los codones 51I y 59R, de comunidades del distrito Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas durante 2022.

Figura 7. Alineamiento múltiple de secuencias del gen *Pfdhps* de *P. falciparum* con mutación en el codón 581G en comunidades del distrito Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022.

Figura 8. Alineamiento múltiple del gen *Pfmdr1* de *P. falciparum* con mutaciones en los codones 86Y y 184F en muestras de comunidades del distrito Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022.

RESUMEN

Introducción: La malaria representa una amenaza para la salud pública y la farmacorresistencia a los antimaláricos dificulta el control y la eliminación de la enfermedad. La resistencia a la artemisinina, cloroquina, pirimetamina, sulfadoxina y mefloquina se pueden explorar mediante el análisis de polimorfismos en los genes *PfK13*, *Pfcrt*, *Pfdhfr*, *Pfdhps* y *Pfmdr1*, respectivamente. **Objetivo:** Caracterizar molecularmente *Plasmodium falciparum* asociados a resistencia a los antimaláricos en comunidades del distrito Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022. **Método:** Estudio descriptivo, prospectivo de casos positivos de *P. falciparum*. Se obtuvo ADN genómico de treinta muestras y la especie se confirmó por PCR en tiempo real. Los polimorfismos en estudio se amplificaron por PCR anidada y PCR convencional, seguida por secuenciación Sanger. Las secuencias se analizaron y se alinearon con la secuencia de tipo salvaje de *Plasmodium falciparum*. **Resultados:** Todas las muestras evaluadas portaron alelos mutantes en la posición 72S y 76T para *Pfcrt*, 16V, 50R y 51I para *Pfdhfr*, 540E y 581G para *Pfdhps* y 184F para *Pfmdr1*. Sin embargo, para el gen *Pfk13* no se encontraron mutaciones. **Conclusiones:** El uso de PCR en tiempo real fue útil para la correcta identificación de *P. falciparum*. Mientras que el análisis de marcadores moleculares permitió caracterizar el perfil genético asociado a resistencia a cloroquina, sulfadoxina, pirimetamina y mefloquina, así como la sensibilidad a artemisinina.

Palabras clave: Resistencia a Medicamentos, *Plasmodium falciparum*, Antimaláricos, Amazonas, Marcadores genéticos, Polimorfismo genético.

ABSTRACT

Introduction: Malaria represents a public health threat and drug resistance to antimalarials hampers the control and elimination of the disease. Resistance to artemisinin, chloroquine, pyrimethamine, sulfadoxine and mefloquine can be explored by analyzing polymorphisms in the *PfK13*, *Pfcrt*, *Pfdhfr*, *Pfdhps* and *Pfmdr1* genes, respectively.

Objective: Molecular characterization of *Plasmodium falciparum* associated with antimalarial resistance in communities of the Rio Santiago district, Condorcanqui, Amazonas 2022. **Methodological design:** Prospective, descriptive study of positive cases of *P. falciparum*. Genomic DNA was obtained from thirty samples and the species was confirmed by real-time PCR. The polymorphisms under study were amplified by nested PCR and conventional PCR, followed by Sanger sequencing. The sequences were analyzed and aligned with the 3D7 wild-type sequence. **Results:** All samples evaluated carried mutant alleles at position 72S and 76T for *Pfcrt*, 16V, 50R and 51I for *Pfdhfr*, 540E and 581G for *Pfdhps* and 184F for *Pfmdr1*. However, for the *Pfk13* gene, no mutations were found. **Conclusions:** The use of real-time PCR was successful to identify *P. falciparum*. Molecular marker analysis allowed the characterization of the genetic profile associated with drug resistance to chloroquine, sulfadoxine, pyrimethamine and mefloquine, as well as sensitivity to artemisinin.

Keywords: Drug Resistance, *Plasmodium falciparum*, Antimalarials, Amazonas, Genetic markers, Genetic polymorphism.

I. INTRODUCCIÓN

La malaria es una de las enfermedades metaxénica más relevantes en salud pública a nivel mundial (Recht et al., 2017). Es originada por parásitos pertenecientes al género *Plasmodium* y transmitida a través de la picadura de mosquitos hembras del género *Anopheles* spp. (Zekar y Sharman, 2020). Hay cuatro especies que infectan a los humanos: *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum* (Escalante y Pacheco, 2019), los dos últimos parásitos son responsables de los casos de morbilidad y mortalidad (Varo, Chaccour y Bassat, 2020). Se han identificado también casos de *P. knowlesi* en humanos; sin embargo, es considerado una zoonosis (Sato, S., 2021). *P. falciparum* es la especie de mayor impacto al causar cuadros patológicos como anemia severa, malaria cerebral e incluso puede llevar a la muerte. Este parásito tiene un ciclo asexual eritrocítico de 48 horas provocando una rápida progresión de la enfermedad (Maier, Matuschewski, Zhang y Rug, 2018).

En el Perú, la malaria es endémica en los valles occidentales de la costa norte, en la cuenca amazónica e incluso en los valles interandinos hasta los 2,300 m.s.n.m (MINSA, 2020). En el año 2022, un total de 10939 casos positivos fueron reportados, siendo el 82.50% (9025) causado por *P. vivax*, 17,44% (1908) por *P. falciparum* y 0,06% (6) por *P. malariae* (MINSA, 2022). En el 2021 y 2020 se reportaron 17658 y 15235 casos respectivamente, donde el 80,24% (14170) y 79,99% (12186) fue por *P. vivax*, 19,74% (3487) y 20,01% (3049) por *P. falciparum*, provenientes del departamento de Loreto, Junín, San Martín, Tumbes, Cusco, Ayacucho, Cajamarca, La libertad, Madre de Dios, Lima y Amazonas (Minsa, 2020 y 2021). Entre los años 2015 y 2019, se registraron un total de 244,723 casos, la mayoría se concentraron en Loreto con 95,6%, seguido por Amazonas (1,8%), con mayor número de casos en el distrito de Río Santiago, luego Junín (1,0%), y San Martín con 0,7% de los casos (Montenegro et al., 2021).

El tratamiento de terapia combinada con artemisinina (Artemisinin-based combination therapy, ACT) es la opción recomendada de primera línea. Actualmente, avances en la investigación genética y genómica del parásito, han tenido un papel significativo sobre la identificación de genes responsables, especialmente aquellos que se asocian con la resistencia a los antimaláricos (Su, Lane, Xia, Sá, y Wellems, 2019). Sin embargo, la resistencia de *P. falciparum* a medicamentos disponibles, hace difícil controlar y eliminar la enfermedad, razón por la cual es de importancia la vigilancia sobre la efectividad de los antimaláricos (Valenzuela et al., 2019).

La resistencia se puede evaluar mediante el análisis de polimorfismos de un solo nucleótido (Single Nucleotide Polymorphism, SNPs). Por ejemplo, la asociación con resistencia a sulfadoxina-pirimetamina (SP), se ha relacionado con mutaciones no sinónimas en las posiciones 16V, 50R, 51I, 59R, 108N/T e 164L del gen dihidrofolato reductasa (*Pfdhfr*) y 436A/F, 437G, 540E, 581G, 613S del gen dihidropteroato sintetasa *Pfdhps* (Pathak et al., 2014). La resistencia a cloroquina (CQ), se ha asociado con los polimorfismos 72 S, 74 I, 75 E, 75 K y 76 T en el gen transportador de resistencia a cloroquina *Pfcr*t (Shah et al., 2015). Otros estudios han demostrado que los polimorfismos en el gen de multiresistencia (*Pfmdr1*) 86Y, 184F, 1034C, 1042D y 1246Y están vinculados a la resistencia a mefloquina (MQ) y cloroquina (Pathak et al., 2014). Las mutaciones del gen hélice kelch (K13) asociadas a resistencia a artemisinina son: 543T, 493H, 580Y, 446I, 539T, 578S, 574L, 553L, 458Y y 561H (Stokes et al., 2021). Por lo que, el uso de estos marcadores es muy oportuno para la vigilancia futura de la resistencia y para informar las pautas de tratamiento (Menard et al., 2016).

Frente a esta problemática, se planteó la siguiente interrogante: ¿Cuáles son las características moleculares de *P. falciparum* asociadas a resistencia de antimaláricos en comunidades del distrito de Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022? Además, considerando que existe diversidad molecular, el objetivo general fue: Caracterizar molecularmente *P. falciparum* asociada a resistencia a los antimaláricos en las comunidades del distrito Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022. Así mismo, se consideraron tres objetivos específicos: verificar las especies de *Plasmodium falciparum* en comunidades del distrito Río Santiago Condorcanqui, Amazonas 2022, mediante PCR en tiempo real. Identificar mutaciones en los genes *Pfcr*t, *Pfdhps*, *Pfdhfr*, *Pfmdr1* y *Pfk13* relacionados a resistencia de *P. falciparum* y determinar el genotipo circulante de *P. falciparum* asociados a resistencia a los antimaláricos en las comunidades del distrito de Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022.

Por lo expuesto, la investigación brinda información relevante sobre el genotipo resistente a los antimaláricos en el departamento de Amazonas y con ello contribuye a la epidemiología local para el tratamiento y vigilancia de *P. falciparum*. Finalmente, permite establecer una línea base para investigaciones posteriores que contemplen además ensayos *in vitro* o de eficacia terapéutica que permitan evaluar el fenotipo.

II. MARCO TEÓRICO

1. ANTECEDENTES

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2019 murieron 229 millones de personas a causa de la malaria y 409000 en 87 países, el mayor número de casos notificados ocurrió en África (94%), seguida del Sureste Asiático (3%), el Pacífico Occidental y las Américas presentaron el 1% (OMS, 2020). Sin embargo, en Brasil, Colombia, Venezuela (República Bolivariana), Guyana, Nicaragua y Panamá han visto una disminución de malaria en el 2020. Por otro lado, los casos aumentaron en Honduras, Costa Rica, Suriname; así mismo, la transmisión de malaria en el Perú aumentó en Tumbes y Amazonas (OPS, 2020). Desafortunadamente, *P. falciparum* ha mostrado una amplia resistencia a medicamentos de primera línea tales, como: cloroquina y sulfadoxina-pirimetamina (SP), causando mortalidad y morbilidad (Ashley et al., 2014). Estos antimaláricos han sido reemplazados por terapias combinadas basadas en artemisinina (ACT) (Dondorp et al., 2009). Sin embargo, existen reportes de resistencia a la terapia combinada con artemisinina en el sudeste asiático, repercutiendo con consecuencias devastadoras para el control de la enfermedad (Ashley et al., 2014).

A lo largo de los años, diversas investigaciones se han realizado para contribuir con la vigilancia de parásitos resistentes a antimaláricos. En 2016, Chenet, y sus colaboradores analizaron 98 muestras de *P. falciparum* en Guyana, realizando una PCR-anidada y secuenciamiento por Sanger para determinar alelos mutantes en *Pfk13*, *Pfcrt*, *Pfdhfr*, *Pfdhps* y *Pfmdr1*, reportando una mutación en la posición del aminoácido C580Y del dominio de la hélice K13 en 5 muestras. Además, en la mayoría de casos positivos encontraron un genotipo *Pfcrt* SVMNT (codones 72–76), triple mutante 437G/540E /581G de *Pfdhps*, 2 genotipos: triple mutante 50R /51I /108N y doble mutante 51I /108N para *Pfdhfr* y 2 genotipos mutantes de *Pfmdr1* en 184F /1042D /1246Y (triple mutante) y 184F /1034C /1042D /1246Y (cuádruple mutante). Por lo que, en Guyana y países vecinos, se justificaba la vigilancia molecular continua de la terapia combinada basada en artemisinina y de los demás antipalúdicos (Chenet, S., et al., 2016).

En 2017, se publicó un estudio de las mutaciones *Pfdhfr*, *Pfdhps*, *Pfmdr1* y *Pfcrt* en genes de *P. falciparum*, en Guinea Ecuatorial Continental. El gen *Pfdhfr* evidenció la

presencia de un triple mutante (51I/59R/108N) y una mutación en la posición 164L. Además, se identificó tres clases de mutantes en los genes *Pfdhfr* y *Pfdhps*: parcialmente resistentes (*Pfdhfr* 51I/59R/108N y *Pfdhps* 437G), totalmente resistentes (*Pfdhfr* 51I/59R/108N + *Pfdhps* 437G/540E) y súper resistentes (*Pfdhfr* 51I/59R/108N y *Pfdhps* 437G/540E/581G). Por otro lado, se encontró una doble mutación en las posiciones de 86Y y 1246Y en el gen *Pfmdr1*; así mismo, se evidenciaron mutaciones combinadas en *Pfmdr1* y *Pfcr1* (86Y y 76T). Los resultados mostraron un alto nivel de mutaciones en los genes de *P. falciparum* relacionados con la resistencia a SP, atribuyendo este hecho al retiro fallido del tratamiento de SP en estas zonas (Berzosa *et al.*, 2017).

En 2018, se publicó un estudio realizado en Brasil, en donde se evaluaron alelos mutantes relacionados al dominio de la hélice del gen *K13* de *P. falciparum*. Se realizó la amplificación de 69 muestras por PCR-anidada, se secuenciaron y se alinearon. Los autores determinaron que todas las muestras presentaban un genotipo salvaje, indicando la eficacia de la terapia combinada basada en artemisinina (Gomes *et al.*, 2018).

En Sudán, se analizaron 20 muestras provenientes del hospital East Nile. Realizaron una PCR-anidada para amplificar el gen *Pfcr1* y posteriormente realizaron un secuenciamiento Sanger. Como resultado, obtuvieron que el 80% de las muestras presentaron una mutación en el codón 76 del gen *Pfcr1* y el 20% presentó el tipo salvaje. Por lo tanto, concluyeron que existe un elevado porcentaje de cepas mutantes asociadas a la resistencia al tratamiento con cloroquina (Mohammed *et al.*, 2018).

En el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP), examinaron microscópicamente 268 muestras de casos sospechosos de malaria, todos ellos importados. Las muestras positivas por microscopía fueron sometidas a PET-PCR para la confirmación de especies, determinando que 15 muestras fueron positivas para *P. falciparum*, 27 para *P. vivax* y 4 infecciones mixtas. Las muestras positivas para *P. falciparum* se secuenciaron por Sanger, determinando genotipos tipo salvaje para *Pfk13*, mientras que *Pfcr1* mostró cuatro genotipos mutantes (CVMNT, CVMET, CVIET y SVMNT) y para *Pfmdr1* se mostraron tres genotipos mutantes (184F/1034C/1042D/1246Y, Y184F/N1042D/D1246Y y Y184F) (Escobar *et al.*, 2020).

En Quibdó, Colombia, se llevó a cabo un estudio empleando secuenciación Sanger para analizar la presencia de polimorfismos en genes asociados a resistencia de cloroquina y sulfadoxina-pirimetamina en *P. falciparum*. Se examinaron 85 muestras del 2018 - 2019, genotipificando dichas muestras para evaluar mutaciones en los genes *Pfcr* (codones 72-76), *Pfdhfr* (codones 51, 59, 108 y 164) y *Pfdhps* (codones 436, 437, 540 y 581). Los resultados revelaron que los aislados portaron alelos mutantes para *Pfcr* (K76T y N75E) y para *Pfdhfr* (N51I y S108N). No obstante, para el gen *Pfdhps*, sólo se observaron mutaciones en el codón A437G. Los autores concluyeron que sus hallazgos confirmaban la fijación de alelos resistentes a cloroquina y pirimetamina, indicando que estos medicamentos no eran apropiados para su uso en Colombia en la actualidad (Guerra et al., 2022).

Entre 2018 - 2021, se realizaron investigaciones en la región de Mosquitia entre Nicaragua y Honduras, analizaron 205 muestras de sangre de pacientes infectados por *P. falciparum*. Las muestras positivas se amplificaron mediante PCR anidada para los genes *Pfcr* y *Pfmdr1*, luego realizaron el secuenciamiento para evaluar las posiciones que abarca del 72 al 76 para el gen *Pfcr* y las posiciones 86, 184, 1034, 1046 y 1246 para el gen *Pfmdr1*. Determinaron que todas las muestras revelaron el genotipo de tipo salvaje CVMNK para el gen *Pfcr* asociado con la sensibilidad a cloroquina, mientras para el gen *Pfmdr1* presentaron el genotipo NCFDD. Estos resultados establecen que aún no existen mutaciones en el gen *Pfcr* y, además, reporta tres posiciones con mutaciones fijas en el gen *Pfmdr1* (Fontecha et al., 2021).

Schmedes et al. (2021), evaluaron las mutaciones en el dominio de la hélice kelch 13 de *P. falciparum*, mediante el secuenciamiento de Sanger. Un total de 2865 muestras de sangre provenientes de 9 países: Angola, Benín, República Democrática del Congo (RDC), Guinea, Kenia, Malawi, Malí, Tanzania y Zambia durante el 2014 al 2018, fueron sometidas a extracción de ADN y amplificadas mediante PCR. El secuenciamiento de todas las muestras fueron analizadas y alineadas, determinando que 2753 muestras eran de tipo salvaje y 112 presentaban mutaciones en las posiciones 416,419,433,471,477 ,504 ,522, 568 y 578.

En Perú, también se han realizado estudios para contribuir con la vigilancia de *P. falciparum*. En Loreto, se realizó un estudio que investigó la asociación entre las mutaciones

puntuales en los genes *Pfdhfr* y *Pfdhps* de *P. falciparum* y su respuesta clínica en pacientes con diagnóstico de malaria no complicada por esta especie. Se examinaron 86 muestras de sangre de pacientes antes de recibir tratamiento con SP, centrándose en los codones S108N/T, N51I, C59R, I164L y C50R del gen *Pfdhfr* y los codones A436G, A437G, K540E, A581G y A613S/T del gen *Pfdhps*. Los resultados revelaron infecciones causadas por parásitos con 3 mutaciones en *Pfdhfr* (108N/51I/164L) y 2 (581G/437G) o 3 mutaciones en *Pfdhps* (581G/437G/540E), lo cual se asoció con la falla del tratamiento con SP. El autor concluyó que a medida que aumentaba el número de mutaciones en ambos genes (*Pfdhfr* y *Pfdhps*), también aumentaba el riesgo de fracaso en el tratamiento con SP (Salas, C. 2007).

En el 2010 - 2012, se reportó un brote de 210 casos de malaria en Tumbes. Para identificar la especie causante del brote, se colectaron 57 muestras de sangre en papel filtro del total de casos reportados, luego realizaron la extracción de ADN y la identificación de especie fue por PCR-anidada. Se identificaron 54 muestras positivas a *P. falciparum* y 3 mixtas (*P. vivax* / *P. falciparum*). Posteriormente, secuenciaron el ADN de las muestras para detectar mutaciones puntuales en la variante B V1 y clon B de *P. falciparum*. Los autores, reportaron el genotipo SVMNT para *Pfcr* y mutaciones en las posiciones 437/540/581 para *Pfdhps* y 184/1034/1042/1246 para *Pfmdr1*. Por otro lado, el clon B y el linaje B V1 difirieron en el haplotipo *Pfdhfr*; mientras que, el clon B era 51I/108N/164L, la variante B V1 del brote y el aislado del parásito de Requena tenían el haplotipo 50R/51I/108N (Baldeviano et al., 2015).

En el 2015, se realizó un estudio en muestras de 60 pacientes con malaria severa complicada. La genotipificación para el gen *Pfdhfr* fue mediante Sanger y para el gen *Pfdhps* fue mediante PCR-RFLP y PCR alelo-específico. Los resultados mostraron que el 84% de las muestras presentaban mutaciones en N51I, S108N, I164L y el 16% tenían una sólo mutación en S108N; mientras que, para el gen *Pfdhps*, el 78% presentó mutaciones triples 437G/540E/581G. Por tanto, el autor concluyó que los marcadores de resistencia a nivel molecular debían tenerse en cuenta durante el seguimiento de los casos, sobre todo cuando se evidencia la presencia de un brote (Santolalla, M. 2015).

En la Cuenca Amazónica de Loreto Perú, se realizó una investigación con el objetivo de analizar la genética poblacional de *P. falciparum* en 63 muestras colectadas entre 2015 -

2019. La genotipificación de las muestras se realizó en regiones asociadas a la resistencia de medicamentos. Se observó que todas las muestras de *P. falciparum* presentaban mutaciones resistentes a cloroquina (CQ) en el gen *Pfcr*. Así mismo, en los genes *Pfdhfr* y *Pfdhps* de 53 muestras se identificaron mutaciones asociadas a la resistencia de sulfadoxina. Además, no se encontraron mutaciones en el Kelch 13. Los autores concluyeron que, la alta prevalencia de mutaciones de resistencia a CQ podría deberse a una presión selectiva generada por el esquema de tratamiento de *P. vivax* (Villena et al., 2022).

Finalmente, estudios recientes han revelado el resurgimiento de *P. falciparum* en comunidades nativas del distrito de Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas. El estudio se basó en un tamizaje de 2718 muestras de sangre en 21 comunidades del distrito; donde, durante el primer trimestre del 2020, se detectaron 220 casos positivos a malaria, de los cuales, 46 correspondieron a *P. falciparum*, 160 a *P. vivax* y 6 a infecciones mixtas (Montenegro et al., 2020). Sin embargo, no se han evidenciado estudios de marcadores asociados a resistencia a los antimaláricos.

2. BASES TEÓRICAS

La malaria presenta una elevada tasa de incidencia a nivel global, cuya infección es causada por protozoos del género *Plasmodium*. Se transmite al humano por la picadura del mosquito hembra del género *Anopheles* (Campuzano y Blair, 2010). Su ciclo de vida comprende una fase sexual en los mosquitos y una asexual en el humano, estos parásitos migran primero al hígado y luego a los glóbulos rojos (Kariuki y Williams, 2020). La enfermedad se manifiesta con cuadros clínicos como parasitemia asintomática, paludismo no complicado o paludismo grave (Hernández, Chuprine y Carrillo, 2020). Esta enfermedad es principalmente causada por *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*; sin embargo, la especie con mayores complicaciones clínicas severas y con desenlace fatal es *P. falciparum* (Escalante y Pacheco, 2019).

En las últimas décadas se ha incrementado el uso de técnicas moleculares para proporcionar un diagnóstico fiable, en la identificación de microorganismos además de conocer sus secuencias, genotipos y resistencia a fármacos. Entre las técnicas moleculares más utilizadas encontramos a: la PCR convencional, PCR en tiempo real o cuantitativa,

microarreglos (Microarrays) y secuenciación del genoma (Diz, 2020). La PCR en tiempo real, permite la identificación, caracterización y cuantificación de microorganismos patógenos, con menor riesgo de contaminación cruzada (Zheng y Cheng, 2017). Esta técnica mejora la especificidad, sensibilidad e incluso la detección de infecciones mixtas y la posibilidad de determinar el nivel de parasitemia (Van Bergen et al., 2021).

En diversos campos de la biología, los marcadores moleculares representan un elemento necesario para detectar genes de interés, permitiendo determinar variaciones genéticas (Alcántara, 2007). Según Hodoameba (2021), el uso de marcadores moleculares de resistencia a *P. falciparum*, ha permitido monitorear y conocer la propagación del parásito resistente a los fármacos que incluyan mutaciones puntuales en los genes: *Pfcr* asociada a la resistencia cloroquina, *kelch 13* asociada a la resistencia a artemisinina, *Pfdhfr* y *Pfdhps* asociadas a la resistencia de sulfadoxina-pirimetamina y *Pfmdr1* asociada a resistencia de múltiples fármacos como mefloquina, cloroquina, amodiaquina, lumefantrina, entre otros.

El dominio de la hélice de Kelch del gen K13, codifica una proteína de 726 aminoácidos y se ubica en cromosoma 13 relacionado con la resistencia a terapia combinada basada en artemisinina; ACT (Talundzic et al., 2015). La función de esta proteína alberga múltiples puntos de interacción entre proteína-proteína y desempeña diversas funciones celulares como la degradación de proteínas regulada por ubiquitina hasta la participación en respuestas frente al estrés oxidativo (Straimer et al., 2015). Existen ocho mutaciones en el dominio de la hélice del gen *Pfk13* (P441L, F446I, S449A, N458Y, P553L, V568G, P574L y L675V) que están relacionado con un retraso en la eliminación del parásito en la sangre. Además, hay cinco mutaciones (Y493H, R539T, I543T, R561H y C580Y) que se asocian con resistencia en pruebas in vitro o in vivo (Gomes et al., 2018). En los mutantes, se observaron cambios de aminoácidos en ubicaciones específicas, por ejemplo, P441L indica que la prolina en la posición 441 fue sustituida por leucina. (Ariey et al., 2014, Menard et al., 2016, Ramakanta et al., 2020).

La resistencia a la cloroquina en el gen *Pfcr* (transportador resistente a la cloroquina), ubicado en el cromosoma 7 del genoma de *P. falciparum* (Pinedo et al., 2008 y Shah et al., 2015). Este gen codifica una proteína de 424 aminoácido localizada en la membrana de la vacuola digestiva del parásito (Huang et al., 2016). Entre las mutaciones

que se asocian a la resistencia a cloroquina son: C72S, M74I, N75E y K76T, como resultado de una mutación el cambio de cisteína (codón TGT) por serina (codón TCT) en la posición 72 de *Pfcr*t (Berzosa et al., 2017). Existen distintos genotipos asociados con la resistencia a cloroquina como: En Guinea el genotipo SVMNT, CVMNT en el Sudeste asiático que se extendió hasta África y en América del Sur el genotipo SVMNT/CVMNT en Brasil y Perú, CVMET/CVMNT en Ecuador y Colombia (Griffing et al., 2010).

Los genes *Pfdhfr* y *Pfdhps*, están relacionado con la resistencia a la pirimetamina y sulfadoxina, se ubican en el cromosoma 4 y 8 del genoma de *P. falciparum*, respectivamente. Su acción de estos genes es inhibir las enzimas dihidrofolato reductasa (DHFR) y dihidropteroato sintetasa (DHPS) de *P. falciparum* (Baraka et al., 2015). Específicamente, la resistencia a la pirimetamina está vinculada a varios polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en el gen *Pfdhfr* como las mutaciones: V16A, con sustitución de valina (V-GTA) por alanina (A-GCA), C50R, sustitución de cisteína (C-TGT) por arginina (R-CGT), N51I, sustitución de asparagina (N-AAT) por isoleucina (I-ATT), C59R, sustitución de cisteína (C-TGT) por arginina (R-CGT), S108N, sustitución de serina (S-AGC) por asparagina (N-AAC), y I164L con sustitución de isoleucina (I-ATA) por leucina (L-CTA) asociados a resistencia a pirimetamina (Pathak et al., 2014 y Galindo et al., 2010). Los parásitos con las mutaciones S436A, con sustitución de serina (S-AGT) por alanina (A-GGT), A437G, sustitución de alanina (A-GCT) por glicina (G-GGT), K540E sustitución de lisina (L-AAA) por glutamina (E-GAA), A581G sustitución de alanina (A-GCG) por glicina (G-GGG) y A613S, sustitución de alanina (A-GCC) por serina (S-TCC) asociados a resistencia a sulfadoxina en el gen *Pfdhps* (Rosillo et al., 2023).

El gen transportador de resistencia a múltiples fármacos (*Pfmdr1*) se ubica en cromosoma 5 del genoma de *P. falciparum*, este gen codifica una glicoproteína p que pertenece a la familia de transportadores de casetes de unión a trifosfato de adenosina y las mutaciones para el gen *Pfmdr1*, están vinculadas a la resistencia a diversos fármacos como: mefloquina, halofantrina, quinina y lumefantrina (Valenzuela et al., 2019). Hasta la fecha se han identificados cinco mutaciones de aminoácidos que son predominantes a nivel mundial como N86Y, Y184F, S1034C, N1042D y D1246Y que se han observado con mayor frecuencia en aislamientos de Asia, África y América (Veiga et al., 2016). La alteración de

tirosina (TAT) por asparagina (TTT) en la posición 184 de *Pfmdr1* es uno de los principales marcadores de resistencia a mefloquina (Mekhlafi et al., 2022).

Las mutaciones en estos genes se han utilizado para monitorear y vigilar la resistencia al tratamiento en muchas áreas donde la malaria es endémica (Pathak et al., 2014). Las mutaciones que se analizan en este estudio se encuentran detalladas en la Tabla 1.

Tabla 1

Perfil de mutaciones moleculares en los genes Pfdhfr, Pfdhps, Pfmdr1, Pfcr1 y Pfk13 de P. falciparum relacionadas con la resistencia a diferentes fármacos antipalúdicos.

Genes	Cromosoma	Codones			
<i>Pfk13</i>	13	P441 L	F446 I	S449 A	N458 Y
		P553 L	V568 G	P574 L	L675 V
		Y493 H	R539 T	I543 T	R561 H
<i>Pfcr1</i>	7	C580 Y			
		C72 S	M74 I	N75 E	K76 T
<i>Pfdhfr</i>	4	V16 A	C50 R	N51 I	C59 R
		S108 N/T		I164 L	
<i>Pfdhps</i>	8	S436 A/F	A437 G	K540 E	A581 G
		A613 S			
<i>Pfmdr1</i>	5	N86 Y		Y184 F	

Aminoácido P: Prolina S: Serina V: Valina Y: Tirosina H: Histidina T: Treonina C: cisteína E: Glutamina
 F: Fenilalanina N: Asparagina L: Leucina G: Glicina R: Arginina I: Isoleucina M: Metionina K: Lisina
 A: Alanina
Aminoácido mutado (resaltado en negrita)

La resistencia a fármacos se define cuando bacterias, virus, hongos y parásitos tienen la capacidad de sobrevivir o multiplicarse frente a una adecuada administración de medicamentos, lo que conlleva a un difícil tratamiento y, por ende, a la propagación de la enfermedad (Reyburn, 2010). Según Shibeshi, Kifle y Atnafie (2020), existen factores que facilitan la aparición de resistencia a los antipalúdicos, como: tasa de mutación del parásito, carga parasitaria en general, potencia del medicamento seleccionado, dosis inadecuada del fármaco, propiedades farmacocinéticas deficientes e incumplimiento del tratamiento.

Las herramientas más utilizadas en la actualidad para la secuenciación de genes o regiones de genomas son: el método de secuenciación capilar (Método de Sanger) y las plataformas de secuenciación de siguiente generación (NGS, Next Generation Sequencing) (Diz, 2020). La Secuenciación por Sanger, es un método que permite determinar las secuencias de ADN hasta 900 pares de bases y de esta manera es posible determinar SNPs que den lugar a sustituciones sinónimas o no sinónimas (Diz, 2020 y CDC-Perú, 2021).

Actualmente, se utiliza una variedad de medicamentos para el tratamiento de la malaria, como los derivados de la artemisinina que se administran junto a mefloquina, piperaquina, lumefantrina y amodiaquina (Ruebush, Neyra, y Cabezas, 2004). De acuerdo a la normativa técnica vigente en el Perú, el tratamiento del paludismo no complicada causado por *P. falciparum*, se basa en el uso de una combinación de mefloquina (MQ) a una dosis de 12,5 mg/kg al día durante 2 días, junto con artesunato (AS), en dosis de 4 mg/kg por día durante 3 días; además, se recomienda el uso de primaquina a una dosis de 10 mg/kg por día para adultos y 0,75 mg/kg por día para niños (MINSA, 2015).

III. MÉTODOS Y MATERIALES

El presente estudio de investigación se realizó en el Instituto de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza en Amazonas (IET-UNTRM) en el Laboratorio de Epidemiología Molecular y Genómica.

1. Tipo y diseño de investigación

La investigación es de tipo descriptivo y transversal con un diseño observacional no experimental (Supo & Zacarías, 2020).

2. Población y Muestra

La población estuvo conformada por todos los pobladores de las comunidades del distrito Río Santiago provincia de Condorcanqui, departamento de Amazonas que asistieron a los establecimientos de salud. La muestra estuvo constituida por 30 casos positivos de *P. falciparum* diagnosticados por microscopía entre el 2019 al 2022 que provenían de las comunidades: Ayambis (4); Chapiza (13); Palometa (1), Chapiza (1) y Alianza Progreso (11). Las muestras de sangre de estos casos positivos fueron brindadas por la Dirección Regional de Salud Amazonas (DIRESA, Amazonas) en conjunto con la Red de Salud de Condorcanqui mediante detección pasiva de casos de malaria.

3. Técnica e instrumentos de recolección de datos

3.1. Técnicas

Se realizó una observación, revisión y análisis documentario (Supo & Zacarías., 2020). La observación estuvo centrada en la extracción de ADN, amplificación de PCR en tiempo real, corridas electroforéticas, secuenciamiento Sanger y empleo de software (Anexo 1).

3.2. Instrumentos de recolección de datos

Se usaron cuadernos de registros de laboratorio y formatos de procesos para los resultados. Se emplearon equipos para: PCR en tiempo real, PCR nested y convencional, electroforesis, Secuenciador por Sanger, software Geneious prime para análisis de las secuencias, publicaciones, buscadores web, laptop y cámara fotográfica.

3.3. Procedimiento

3.3.1 Extracción de ADN de sangre en papel filtro y sangre total

Las muestras obtenidas fueron sometidas a extracción de ADN, se usó el protocolo estandarizado del kit comercial de extracción (QIAamp DNA Mini Kit-250 Cat.Nº.51306).

El ADN obtenido fue almacenado a -20°C, hasta ser usado en las reacciones de la PCR en tiempo real, para la confirmación de la especie y en las PCR para amplificación de los genes de interés.

Protocolo:

- a) Para la extracción de ADN a partir de sangre en papel filtro, se utilizó un círculo de papel (conteniendo la sangre) y se cortó en partes pequeñas empleando una tijera estéril y realizándose sobre una placa. Se colocaron las partes del papel dentro de un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. con 300 uL de buffer fosfato salino (PBS) y se incubó a 56 °C durante toda la noche. Para la extracción de ADN a partir de sangre total, se utilizaron 200 uL de la muestra inicial.
- b) Luego, en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, se añadió 20 uL de proteinasa K, 200 uL de muestra (sobrenadante en caso de muestra de papel filtro) y 200 uL de buffer AL, luego se realizó un vórtex y se colocó al termociclador por 56 °C durante una hora.
- c) Se añadió 200 uL de etanol y se realizó un vórtex para homogenizar la muestra. Luego, todo el contenido fue transferido a la columna de purificación y se realizó una centrifugación a 8000 rpm por 1 minuto.
- d) Se transfirió la columna de purificación al siguiente tubo colector, añadiendo 500 uL de solución de lavado AW1, seguido de una centrifugación a 8000 rpm por 1 minuto.
- e) Posteriormente, la columna de purificación se colocó al siguiente tubo colector. Se añadió 500 uL de la solución de lavado AW2, y se realizó una centrifugación a 14000 rpm durante 3 minutos.
- f) Se descartó el tubo de colector conteniendo la solución que atravesó la columna y se transfirió la columna de purificación a un nuevo tubo estéril de 1,5 mL.
- g) Se añadió 100 uL de buffer AE en el centro de la columna de purificación para eludir el ADN genómico y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- h) Por último, se realizó una centrifugación a 8000 rpm durante 1 minuto, se eliminó la columna de purificación y se obtuvo el ADN, el mismo que se almacenó a -20 °C (Anexo 2 y Anexo 3).

3.3.2 Identificación molecular de *Plasmodium* spp.

La confirmación de *P. falciparum* se realizó por PCR en tiempo real empleando el protocolo de Rougemont et al. (2004). El protocolo consistió en el uso

de oligonucleótidos: Plasmio 1 (5'- GTT AAG GGA GTG AAG ACG ATC AGA - 3'), Plasmio 2 (5' – AAC CCA AAG ACT TTG ATT TCT CAT AA - 3') y las sondas: Falcprobe (5' – AGC AAT CTA AAA GTC ACC TCG AAA GAT GAC T - 3') marcadas con el fluoróforo FAM y Vivprobe (5'AGC AAT CTA AGA ATA AAC TCC GAA GAG AAA ATT CT-3') marcadas con el fluoróforo VIC (Anexo 3). Luego, se preparó un master mix específico para la diferenciación de las especies de *Plasmodium* spp (Tabla 2).

Se añadió 15 µL del master mix en una placa de 96 pocillos y luego se agregó 5 µL ADN, se mezcló por pipeteo y se centrifugó a 300 g por 30 segundos antes de colocarse al termociclador. Se consideraron reacciones para: el control de extracción, controles positivos (cepa 3D7 y cepa Sal 1) y control de reactivo. Las condiciones del perfil térmico estuvieron conformadas por 1 ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C durante 10 minutos, y 40 ciclos de: desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos y alineamiento a 60 °C por 1 minuto.

Tabla 2

Condiciones del master mix para determinación de especies de Plasmodium, mediante PCR en tiempo real, empleados en las muestras provenientes de las comunidades del distrito Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022

Reactivos	Reacción 1X <i>P. vivax/falciparum</i>
Master Mix	10 µL
Agua	1,4 µL
Primer F (plasmo1)	1 µL conc. Final (4 µM)
Primer R (plasmo 2)	1 µL conc. Final (4 µM)
Sonda (vivprobe)	0,8 µL conc. Final (2 µM)
Sonda (falcprobe)	0,8 µL conc. Final (2 µM)
Total	15 µL
Templado	5µL

3.3.3 Amplificación del ADN y generación de productos

Se utilizó un protocolo estandarizado descrito por CDC (Centers for Disease Control and Prevention, por sus siglas en inglés), los marcadores y los primers usados se describen en la Tabla 3. En todas las reacciones de PCR, se consideró el control de extracción y control de reactivos, se incluyó como control positivo a la cepa de referencia 3D7.

Tabla 3

Marcadores, partidores y secuencias de amplicones empleados. por PCR anidado y PCR convencional para P. falciparum.

Marcador	Partidor	Secuencia Nucleotídica	Tamaño (pb)	Tm(°C)
K13	<i>Pfk13_F1</i>	GCAAATAGTATCTCGAAT	1000	46
	<i>Pfk13_R1</i>	CTGGGAACTAATAATAAAGAT		
	<i>Pfk13_F2</i>	GATAAACAAGGAAGAATATTCT		
	<i>Pfk13_R2</i>	CGGAATCTAATGTTATGTTCA	700	54
Crt	<i>Pfcrt_F1</i>	AGCAAAAATGACGAGCGTTATAG		
	<i>Pfcrt_R1</i>	ATTGGTAGGTGGAATAGATTCTC	559	60
	<i>Pfdhps_F1</i>	AACCTAAACGTGCTGTTCAA		
Dhps	<i>Pfdhps_R1</i>	AATTGTGTGATTTGTCCACAA	711	48
	<i>Pfdhfr_F1</i>	ATGATGGAACAAGTCTGCGAC		
Dhfr	<i>Pfdhfr_R1</i>	ACATTTTATTATTCGTTTTTC	700	61
	<i>Pfmdr1_F1</i>	CCGTTTAAATGTTTACCTGCAC		
Mdr1	<i>Pfmdr1_R1</i>	TGGGGTATTGATTCGTTGCAC	799	57

3.3.4 PCR para la amplificación del gen *Pfk13*

La amplificación se realizó por PCR anidada, en dos rondas: para el master mix de la primera PCR, se empleó 3 µL PCR buffer, 1,2 mM MgCl₂, 0,2 mM de desoxinucleótido trifosfato (dNTPs), 1,5 µL con los primers *PfK13_F1* (5'GCAAATAGTATCTCGAAT-3') y *PfK13_R1* (5'CTGGGAACTAATAATAAAGAT-3'), 0,2 µL de Taq polymerase (Invitrogen), 4 µL ADN y se completó con agua de biología molecular hasta una reacción final de 30 µL (Anexo 4). El termociclador (SimpliAmp Applied Biosystems A24811) se configuró con una etapa inicial de desnaturalización a 98 °C durante 30 segundos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 98 °C durante 10 segundos, hibridación

de los oligonucleótidos a 46°C durante 30 segundos, y extensión a 68 °C durante 2 minutos, concluyendo con una etapa de extensión final a 68 °C durante 10 min.

Con el objetivo de aumentar la cantidad del producto amplificado en la primera reacción, se llevó a cabo una segunda ronda, para ello el master mix se preparó utilizando los primers *Pfk13_F2*. 5'- GATAAACAAGGAAGAATATTCT-3' y *Pfk13_R2* 5'-CGGAATCTAATGTTATGTTCA-3', con las mismas concentraciones de la primera reacción y con 4 µL del producto de la primera reacción. La etapa inicial de desnaturalización se llevó a cabo a 94 °C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación de los cebadores a 54°C durante 30 segundos, y extensión a 68 °C durante 10 minutos. Finalmente, una extensión final de 68 °C durante 10 minutos, siguiendo el procedimiento como describe Chenet et al., 2016. Todos los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %.

3.3.5 PCR para la amplificación del gen *Pfcrt*

El master mix de la PCR se preparó utilizando 6 µL buffer PCR, 0.8 µL de MgCl₂, 0.16 µL de desoxinucleótido trifosfato (dNTPs), 1 µL de los primers *Pfcrt_F1*(5'-AGCAAAAATGACGAGCGTTATAG-3') y *Pfcrt_R1*(5'-ATTGGTAGGTGGAATAGATTCTC-3'), 0,2 µL de la enzima Taq polimerasa, 4 µL de ADN y se completó el volumen con agua de biología molecular hasta una reacción final de 30 µL (Anexo 5).

Las condiciones de amplificación para este ensayo se llevaron a cabo en el termociclador (SimpliAmp Applied Biosystems A24811), el ciclaje constó de una fase inicial de desnaturalización a 98 °C durante 4 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 98 °C durante 30 segundos, con una hibridación a 60°C por 1 minuto, y extensión a 68 °C durante 2 minutos. Finalmente, con una extensión final a 68 °C durante 10 minutos, siguiendo las condiciones del protocolo estandarizado y modificado por la CDC y Chenet et al., 2016.

3.3.6 PCR para la amplificación del gen *Pfdhps*

El ADN se amplificó mediante PCR, el volumen de reacción contenía 30 µL, compuesto por 4 µL ADN, 3 µL PCR buffer, 1,2 µL de MgCl₂, 0,24 µL de desoxinucleótido trifosfato (dNTPs), 1,5 µL de los primers *Pfdhps*_F1 (5'-AACCTAAACGTGCTGTTCAA-3') y *Pfdhps*_R1 (5'-AATTGTGTGATTTGTCCACAA-3'), 0,2 µL de la enzima Taq polimerasa y agua de biología molecular (Anexo 6).

Las condiciones de perfil de temperatura para este ensayo, consistieron en una fase inicial de desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, con una hibridación de los oligonucleótidos a 50°C durante 1 minuto, y una extensión a 68 °C durante 2 minutos. Posteriormente, se llevó a cabo una extensión final a 68 °C por 10 minutos, siguiendo las condiciones del protocolo estandarizado y modificado por la CDC y Chenet et al., 2016.

3.3.7 PCR para la amplificación del gen *Pfdhfr*

La amplificación por PCR, se realizó siguiendo un procedimiento de amplificación, con un volumen de reacción que contenía 30 µL, compuesto por 4 µL ADN, con 3 µL PCR buffer, 1,2 µL de MgCl₂, 0,24 µL de desoxinucleótido trifosfato (dNTPs), 1,5 µL de los primers para *Pfdhfr*_F1(5'-ATGATGGAACAAGTCTGCGAC-3') y *Pfdhfr*_R1 (5'ACATTTTATTATTCGTTTTTC-3'), 0,2 µL de la enzima Taq polimerasa y se completó con agua de biología molecular (Anexo 7).

Las condiciones de perfil de temperatura para este ensayo, consistieron en una fase inicial de desnaturalización a 98 °C por 4 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 98 °C por 30 segundos, con una hibridación de los oligonucleótidos a 58°C durante 1 minuto, y una extensión a 68 °C durante 2 minutos. Posteriormente, se llevó a cabo una extensión final a 68 °C por 10 minutos, siguiendo las condiciones del protocolo estandarizado y modificado por la CDC y Chenet et al., 2016.

3.3.8 PCR para la amplificación del gen *Pfmdr1*

El ADN genómico de *P. falciparum* fue amplificado por PCR, de acuerdo al protocolo establecido por CDC se utilizó 4 µL de ADN, 3 µL buffer PCR, 1,2 µL de MgCl₂, 0,24 µL de desoxinucleótido trifosfato (dNTPs), 1,5 µL de los primers *Pfmdr1_F1*(5'-CCGTTTAAATGTTTACCTGCAC-3') y *Pfmdr1_R1*(5'-TGGGGTATTGATTCGTTGCAC-3'), 0,2 µL de la enzima Taq polimerasa y agua de biología molecular, el volumen final fue de 30 µL (Anexo 8).

Las condiciones de perfil de temperatura para este ensayo consistieron en una fase inicial de desnaturalización a 98 °C durante 4 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 98 °C por 30 segundos, con una hibridación de los oligonucleótidos a 58°C durante 1 minuto, y una extensión a 68 °C durante 2 minutos. Posteriormente, se llevó a cabo una extensión final a 68 °C por 10 minutos. Según el protocolo estandarizado y modificado por la CDC y Chenet et al., 2016.

3.3.9. Electroforesis

3.3.9.1. Preparación del gel de agarosa

Los productos obtenidos de la PCR, se revelaron mediante la electroforesis en geles de agarosa al 2 %. Para la preparación del gel se utilizó 1,5 g de agarosa en 75 mL de buffer TAE (Tris acetato EDTA) 1X, esta solución se homogenizó en un frasco de vidrio de 250 mL, luego se calentó en el microondas durante 2 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente por 30 segundos y se añadió 8 µL de SafeView™. Finalmente, el contenido se dispensó en la cubeta de electroforesis, donde se llevó a cabo el proceso de gelificación (Anexo 9).

3.3.9.2. Carga de los productos obtenidos de la PCR en el gel de agarosa

En el proceso de la amplificación se emplearon 10 µL de los productos generados por la PCR, estos se mezclaron con 2,5 µL de buffer DNA Loading Dye (ABMTM, Applied Biological Materials Inc, Canadá), para luego ser cargado en cada pocillo del gel de agarosa. Se utilizó 6 µL del marcador de peso molecular de

100pb (Invitrogen, 15628019) y se llevó a la cámara de electroforesis, la cual contenía buffer TAE (Tris acetato EDTA) 1X, durante 40 min a 90 voltios.

3.3.9.3. Visualización del gel

Los geles fueron expuestos a UV en un fotodocumentador omniDOC (Cleaver Scientific), para la visualización de bandas y las imágenes se registraron en el software del mismo equipo.

3.3.10. Purificación del amplicón

El producto de la amplificación, fue purificado utilizando el kit Exo-CIP™ de New England Biolabs, siguiendo el protocolo estandarizado por el fabricante (Anexo 10), esto con la finalidad de eliminar los excesos de dNTPs y otros reactivos que pueden interferir en el proceso del secuenciamiento.

3.3.11. Secuenciamiento Sanger por electroforesis capilar del ADN de los genes *Pfk13*, *Pfcrt*, *Pfdhfr*, *Pfdhps* y *Pfmdr1*.

Se realizó el proceso de secuenciación en el Analizador Genético ABI 3500 (Applied Biosystems) que permite analizar el DNA basado en fluorescencia, utilizando la tecnología de la electroforesis capilar. Se secuenciaron 30 muestras para cada uno de los genes: *Pfk13* (700pb), *Pfcrt* (559 pb), *Pfdhfr* (700pb), *Pfdhps* (711pb) y *Pfmdr1* (799pb). El producto purificado fue sometido a secuenciación, utilizando el kit Big Dye terminator v3.1 cycle (Applied Biosystems, Foster City, CA) y se utilizaron los mismos cebadores de las reacciones de PCR a una concentración de 1uM.

Cada una de las regiones de interés de los genes fue secuenciada en el Analizador genético 3500 (Applied Biosystems) siguiendo el protocolo estandarizado por parte del IET-UNTRM:

- a) En una placa de 96 pocillos se añadió 1 uL del producto purificado, luego se añadió 2 µL de EDTA (0.125M) junto con 2 µL de acetato (1M) y 30 µL de Etanol al 100% frío. Posteriormente, se mezcló por pipeteo y la placa se selló con un film.
- b) La placa sellada se cubrió con papel aluminio, se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos y se realizó un spin a 3200 rpm por 30 min a 20° C.
- c) Se retiró el sello de la placa y se envolvió en papel toalla con la finalidad de invertir la placa, para luego realizar un spin a 1000 rpm por 5 minutos.

- d) Se añadió 30 µL de Etanol (70% frío) previamente frío, se mezcló y se selló nuevamente la placa, para realizar un spin a 3200 rpm por 15 min a 20 °C.
- e) Posteriormente, se retiró nuevamente el sello, se envolvió la placa con papel toalla, se invirtió y se realizó un spin a 1000 rpm por 5 min.
- f) La placa se expuso a temperatura ambiente por 30 min y se cubrió con papel aluminio.
- g) Finalmente, se agregó 10 µL HiDi (Formamide) a cada pocillo de la placa y se selló, para luego ser sometida a una centrifugación a 1000 rpm por 1 min.
- h) Luego se aplicó shock térmico a la placa, llevando la misma al termociclador a 95 °C por 5 min e inmediatamente después a hielo por 3 min, hasta ser llevado al secuenciador automático Analizador genético 3500 (Applied Biosystems).
- i) Las secuencias fueron descargadas en formato ABI para su posterior análisis y alineamiento, mediante programa software Geneious prime (Molecular Biology and Sequence Analysis).

4. Aspectos éticos

Se solicitó autorización mediante oficio al Instituto de Enfermedades Tropicales de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza, Amazonas (IET-UNTRM). Para el desarrollo del presente trabajo de investigación, se respetó la confidencialidad de la información de los usuarios afectados y solo de uso con fines académicos y científicos (Anexo 11). Cuenta con comité de ética aprobado CIEI-Nº 015 por el proyecto de investigación titulado “Vigilancia genómica de Plasmodium y su impacto en el control de la malaria en comunidades nativas de la región Condorcanqui, Amazonas-MALARIA” con contrato N° PE501078584-2022-PROCIENCIA.

5. Análisis y procesamiento de datos

Para el análisis descriptivo de las variables epidemiológicas se utilizaron herramientas de frecuencias absolutas y frecuencias relativas. Los resultados de la secuenciación obtenidas por el Analizador Genético ABI 3500 (Applied Biosystems), se analizaron y alinearon en el software Geneious prime V2022.2.1 (Molecular Biology and Sequence Analysis), estos fueron comparados con la secuencia de referencia 3D7 para cada uno de los genes: PF3D7_1343700K13, PF3D7_0709000CRT, PF3D7_0810800DHPS, PF3D7_0417200 DHFR y PF3D7_0523000 MDR1. Las secuencias de referencias (Anexo 12) se obtuvieron de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

II. RESULTADOS

1. Caracterización epidemiológica de las muestras analizadas de *P. falciparum*

Durante el periodo 2019 al 2022 se evaluaron 30 muestras positivas a *P. falciparum* de pacientes provenientes de comunidades nativas de la provincia de Condorcanqui las mismas que fueron diagnosticadas por microscopía óptica y confirmadas por PCR en tiempo real. Siendo el sexo femenino el más afectado con 56,6 % al igual que la edad entre 30 a 59 años (Tabla 4).

Tabla 4

*Características de las muestras positivos de *P. falciparum* (n=30) en el distrito del Rio Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022*

Características	n=30	%
Sexo		
Masculino	13	43,4
Femenino	17	56,6
Grupo de edad		
1 a 5 años	3	10
6 a 11 años	4	13,3
12 a 17 años	4	13,3
18 a 29 años	8	26,7
30 a 59 años	9	30
> 60	2	6,7
Comunidades nativas		
Chapiza (CH)	14	46,6
Alianza progreso (AP)	11	36,8
Ayambis (AY)	4	13,3
Palometa (PA)	1	3,3
Años de colección de muestras		
2019	4	13,3
2020	13	43,4
2021	4	13,3
2022	9	30

Las 30 muestras brindadas por la Dirección Regional de Salud Amazonas, fueron identificadas por microscopía positiva a *P. falciparum* y fueron confirmadas mediante PCR en tiempo real con un ciclo umbral (Ct) menor a 39 (Tabla 5 y Figura 1).

Tabla 5

Identificación de P. falciparum por microscopía y PCR tiempo real en comunidades de Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022

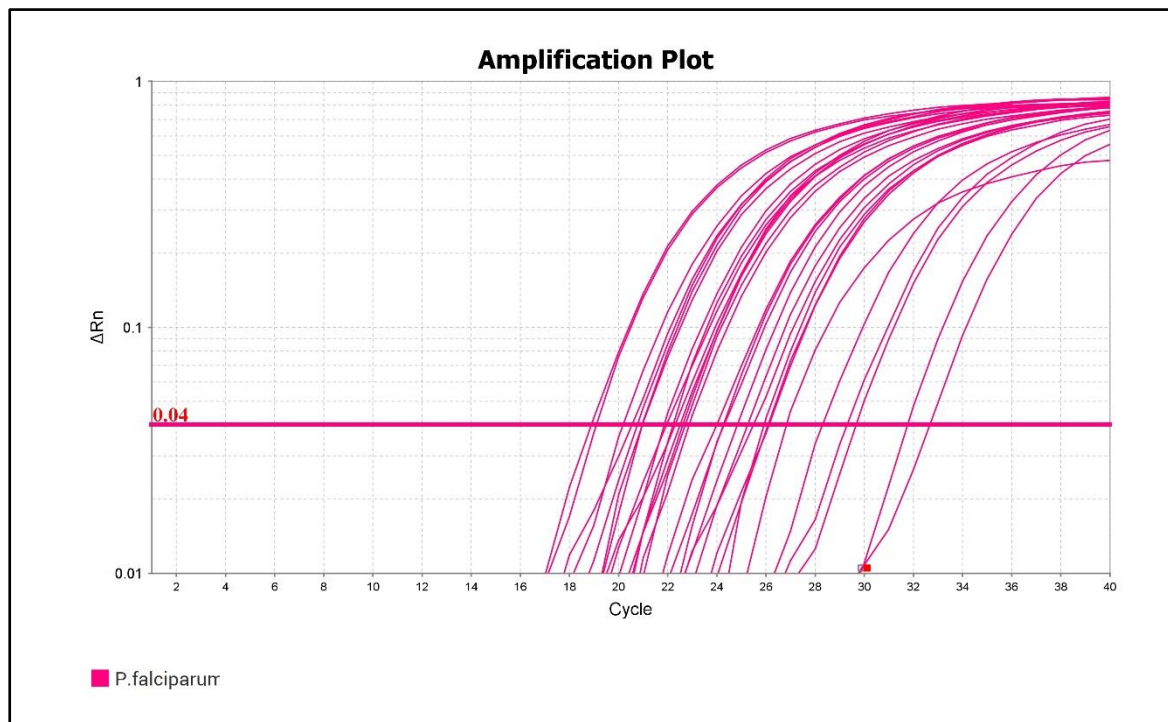
MUESTRA	Identificación de <i>P. falciparum</i>		Resultados
	Microscopia	Ct-PCR	
AY108	<i>P. falciparum</i> (++)	23,59	<i>P. falciparum</i>
AY119	<i>P. falciparum</i> (++; 5Fg)	30,97	<i>P. falciparum</i>
AY125	<i>P. falciparum</i> (++)	28,14	<i>P. falciparum</i>
AY209	<i>P. falciparum</i> (8F)	24,51	<i>P. falciparum</i>
PSCH004	<i>P. falciparum</i> (+F)	23,02	<i>P. falciparum</i>
PSCH006	<i>P. falciparum</i> (+F)	23,09	<i>P. falciparum</i>
PSCH007	<i>P. falciparum</i> (+F)	23,68	<i>P. falciparum</i>
PSCH008	<i>P. falciparum</i> (+F)	21,91	<i>P. falciparum</i>
PSCH009	<i>P. falciparum</i> (+F)	29,03	<i>P. falciparum</i>
PSCH011	<i>P. falciparum</i> (+F)	24,32	<i>P. falciparum</i>
PSCH012	<i>P. falciparum</i> (+F)	27,71	<i>P. falciparum</i>
PSCH014	<i>P. falciparum</i> (+F)	23,35	<i>P. falciparum</i>
PSCH015	<i>P. falciparum</i> (+F)	27,77	<i>P. falciparum</i>
PSCH016	<i>P. falciparum</i> (+F)	27,35	<i>P. falciparum</i>
PSCH017	<i>P. falciparum</i> (+F)	26,09	<i>P. falciparum</i>
PSCH018	<i>P. falciparum</i> (+F)	27,38	<i>P. falciparum</i>
PSCH020	<i>P. falciparum</i> (+F)	24,46	<i>P. falciparum</i>
AP001	<i>P. falciparum</i> (+F)	27,66	<i>P. falciparum</i>
AP002	<i>P. falciparum</i> (+F; +/2Fg)	26,49	<i>P. falciparum</i>
PA21-11	<i>P. falciparum</i> (+F)	27,47	<i>P. falciparum</i>
AP21-19	<i>P. falciparum</i> (+F)	23,59	<i>P. falciparum</i>
AP2-3	<i>P. falciparum</i> (+F; +/2Fg)	29,54	<i>P. falciparum</i>
AP28-3	<i>P. falciparum</i> (+/2Fg)	27,64	<i>P. falciparum</i>
AP22-218	<i>P. falciparum</i> (+/2F; +Fg)	27,71	<i>P. falciparum</i>
AP22-219	<i>P. falciparum</i> (+F)	28,45	<i>P. falciparum</i>
AP22-221	<i>P. falciparum</i> (++)	29,47	<i>P. falciparum</i>
PSCH22-222	<i>P. falciparum</i> (++; +Fg)	31,92	<i>P. falciparum</i>
AP22-223	<i>P. falciparum</i> (+++)	29,31	<i>P. falciparum</i>
AP22-224	<i>P. falciparum</i> (+F)	22,75	<i>P. falciparum</i>
AP22-225	<i>P. falciparum</i> (+/2F; +/2Fg)	28,54	<i>P. falciparum</i>
3D7 (Cepa)	-	27,1	<i>P. falciparum</i>
SAL1(Cepa)	-	29,32	<i>P. vivax</i>
Control reactivo	-	-	Indeterminado
Control extracción	-	-	Indeterminado

Fg: gametocitos de *P. falciparum*, +/2: 40-60 parásitos en 100 campos, +F: 1 parásito por campo,

++F: 2-20 parásito por campo, +++F: 21-200 parásito por campo.

Figura 1

Curvas de amplificación y valores de C_t por PCR en tiempo real, se muestra la identificación de *P. falciparum* de comunidades del distrito Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022



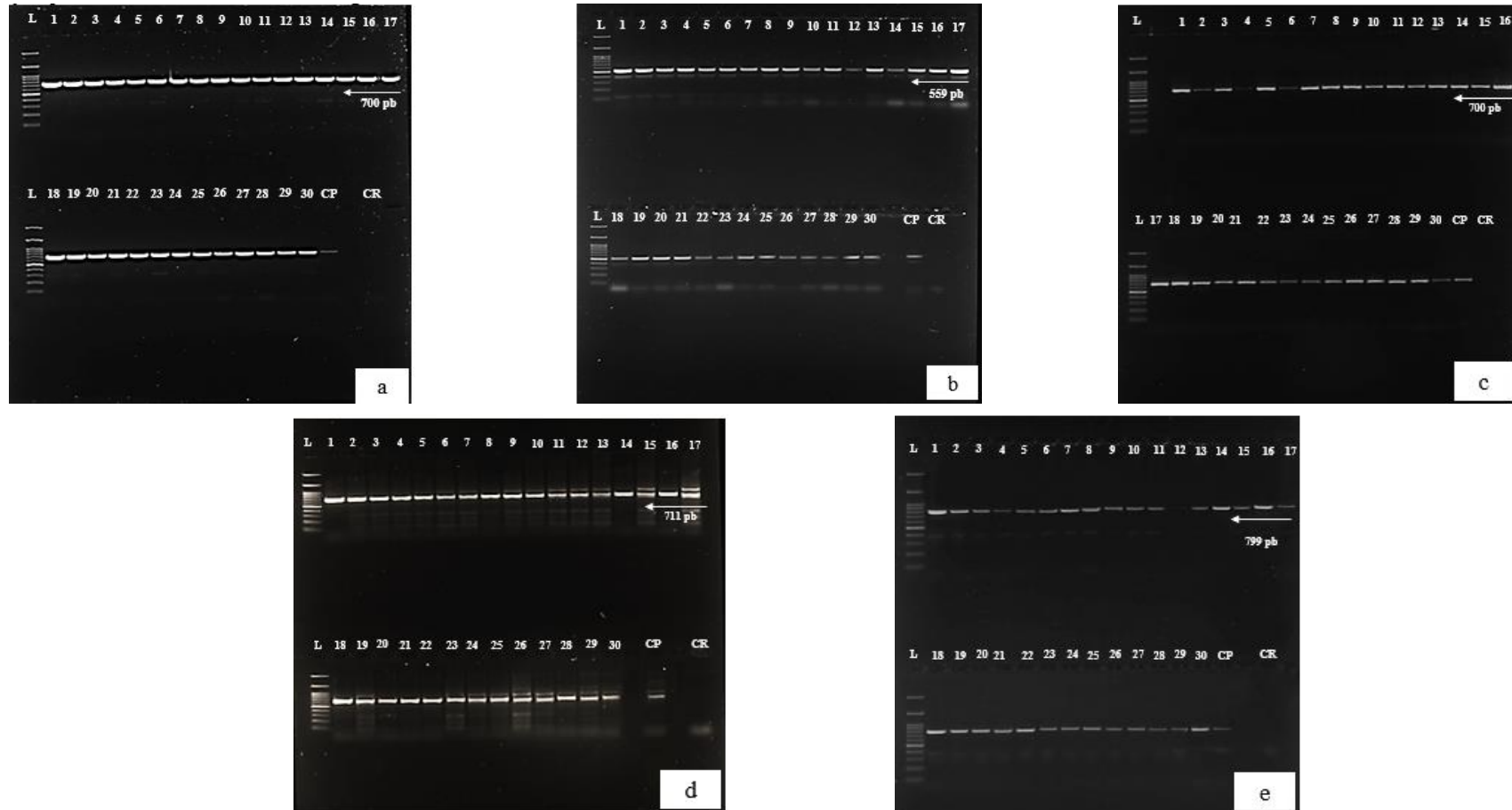
2. Amplificación y visualización de *Pfk13*, *Pfcr1*, *Pfdhfr*, *Pfdhps* y *Pfmdr1* de *P. falciparum* por PCR anidada y convencional.

En todas las amplificaciones se utilizaron como control positivo la cepa de referencia 3D7 de *P. falciparum*, control negativo (CN) y control de reactivo (CR). Se amplificaron con éxito las 30 muestras de *P. falciparum* colectadas entre el 2019 al 2022.

Para el caso del gen *Pfk13* la amplificación del producto obtenido por PCR anidada permitió obtener con éxito el producto de 700 pb. Sin embargo, se empleó PCR convencional para el resto de genes en estudio, obteniéndose como productos de 559 pb para *Pfcr1*, 700 pb para *Pfdhfr*, 711 pb para *Pfdhps* y para el gen *Pfmdr1*, se generó producto de 799 pb (Figura 2).

Figura 2

Electroforesis de la amplificación por PCR de los genes Pfk13, Pfcr1, Pfdhfr, Pfdhps y Pfmdr1 de P. falciparum de comunidades de Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022



Productos de amplificación de genes: **a)** 700 pb de *Pfk13*; **b)** 559 pb de *Pfcr1*; **c)** 700 pb de *Pfdhfr*; **d)** 711 pb de *Pfdhps* y **e)** 799 de *Pfmdr1*. L: Ladder 100 pb, Muestras: 1 -30, CP: Control Positivo 3D7 y CR: Control de Reactivo.

3. Secuenciamiento por Sanger de genes asociados a resistencia en *P. falciparum*: *Pfk13*, *Pfcr1*, *Pfdhfr*, *Pfdhps* y *Pfmdr1*.

Después de la amplificación del producto obtenido por PCR anidada para el gen *Pfk13* y PCR convencional para el resto de genes, se realizó la purificación y secuenciamiento Sanger por electroforesis capilar, que se detalla a continuación:

a. Identificación de mutaciones mediante el análisis de secuenciación de ADN en el gen *Pfk13*

El análisis del secuenciamiento en el dominio de la hélice del gen *Pfk13*, mostró la presencia de alelos silvestres en los codones: P441, F446, N458, M476I, Y493, R539, I543, P553, R561, V568, P574, C580 y A675, en los que no hubo cambio de sus aminoácidos (Tabla 6). El 100% de las muestras de este estudio presentó el genotipo PFNMYRIPRVPCA.

El análisis bioinformático comparativo del alineamiento de secuencias (mediante el software Geneious prime) con la secuencia referencia 3D7, mostró codones conservados para las 30 muestras analizadas. En las Figura 3 y 4 se muestran las posiciones 441, 446, 458, 476I, 493, 539, 543, 553, 561, 568, 574, 580 y 675 manteniendo el genotipo en estado salvaje.

Tabla 6

Ausencia de mutaciones del gen K13 de P. falciparum asociado con resistencia a artemisinina de comunidades de distrito Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022

N°	ID muestras	Años	SNPs del gen Pfk13													Resultado
			441	446	458	476	493	539	543	553	561	568	574	580	675	
			P/L	F/I	N/ Y-I	M/I -V	Y/ H	R/ T	I/T	P/L	R/ H	V/ G	P/L	C/ Y	A/ V	
1	AY108	2019	P	F	N	M	Y	R	I	P	R	V	P	C	A	WT
2	AY119	2019	P	F	N	M	Y	R	I	P	R	V	P	C	A	WT
3	AY125	2019	P	F	N	M	Y	R	I	P	R	V	P	C	A	WT
4	AY209	2019	P	F	N	M	Y	R	I	P	R	V	P	C	A	WT
5	PSCH004	2020	P	F	N	M	Y	R	I	P	R	V	P	C	A	WT
6	PSCH006	2020	P	F	N	M	Y	R	I	P	R	V	P	C	A	WT
7	PSCH007	2020	P	F	N	M	Y	R	I	P	R	V	P	C	A	WT
8	PSCH008	2020	P	F	N	M	Y	R	I	P	R	V	P	C	A	WT
9	PSCH009	2020	P	F	N	M	Y	R	I	P	R	V	P	C	A	WT
10	PSCH011	2020	P	F	N	M	Y	R	I	P	R	V	P	C	A	WT
11	PSCH012	2020	P	F	N	M	Y	R	I	P	R	V	P	C	A	WT
12	PSCH014	2020	P	F	N	M	Y	R	I	P	R	V	P	C	A	WT
13	PSCH015	2020	P	F	N	M	Y	R	I	P	R	V	P	C	A	WT
14	PSCH016	2020	P	F	N	M	Y	R	I	P	R	V	P	C	A	WT
15	PSCH017	2020	P	F	N	M	Y	R	I	P	R	V	P	C	A	WT
16	PSCH018	2020	P	F	N	M	Y	R	I	P	R	V	P	C	A	WT
17	PSCH020	2020	P	F	N	M	Y	R	I	P	R	V	P	C	A	WT
18	AP001	2021	P	F	N	M	Y	R	I	P	R	V	P	C	A	WT
19	AP002	2021	P	F	N	M	Y	R	I	P	R	V	P	C	A	WT
20	PA21-11	2021	P	F	N	M	Y	R	I	P	R	V	P	C	A	WT
21	AP21-19	2021	P	F	N	M	Y	R	I	P	R	V	P	C	A	WT
22	AP2-3	2022	P	F	N	M	Y	R	I	P	R	V	P	C	A	WT
23	AP28-3	2022	P	F	N	M	Y	R	I	P	R	V	P	C	A	WT
24	AP22-218	2022	P	F	N	M	Y	R	I	P	R	V	P	C	A	WT
25	AP22-219	2022	P	F	N	M	Y	R	I	P	R	V	P	C	A	WT
26	AP22-221	2022	P	F	N	M	Y	R	I	P	R	V	P	C	A	WT
27	PSCH22-222	2022	P	F	N	M	Y	R	I	P	R	V	P	C	A	WT
28	AP22-223	2022	P	F	N	M	Y	R	I	P	R	V	P	C	A	WT
29	AP22-224	2022	P	F	N	M	Y	R	I	P	R	V	P	C	A	WT
30	AP22-225	2022	P	F	N	M	Y	R	I	P	R	V	P	C	A	WT.

El 100% de las muestras presenta el genotipo PFNMYRIPRVPCA.

Aminoácidos: P: prolina , L: leucina, F: fenilalanina, I: isoleucina, N: asparagina, Y: tirosina, M: metionina, V: valina, H: histidina, R: arginina, T: treonina, G: glicina, C: cisteína, A: alanina, N: número de muestras, WT: Wild type (alelos silvestres).

Figura 3

Alineamiento múltiple de secuencias de nucleótidos del gen *Pfk13* de *P. falciparum* en los codones 441,446,458,476,493,539 y 543 en estado salvaje de comunidades del distrito Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022

	1,324	1,326	1,339	1,341	1,375	1,377	1,429	1,431	1,480	1,482	1,618	1,620	1,630	1,632
	1,321	1,323	1,336	1,338	1,372	1,374	1,426	1,428	1,477	1,479	1,615	1,617	1,627	1,629
1. K13 Reference Translation	A C C A T		A T T T T		A A A T T		T A T G T		A T A C G		T A G A A		T A T T G	
	P		F		N		M		Y		R		I	
kelch protein K13														
gene														
kelch protein K13 mRNA														
P441L			F446I		N458Y/I		M476I/V		Y493H		R539T		I543T	
FWD 2. AY108	A C C A T		A T T T T		A A A T T		T A T G T		A T A C G		T A G A A		T A T T G	
FWD 3. AY119	A C C A T		A T T T T		A A A T T		T A T G T		A T A C G		T A G A A		T A T T G	
FWD 4. AY125	A C C A T		A T T T T		A A A T T		T A T G T		A T A C G		T A G A A		T A T T G	
FWD 5. AY209	A C C A T		A T T T T		A A A T T		T A T G T		A T A C G		T A G A A		T A T T G	
FWD 6. PSCH004	A C C A T		A T T T T		A A A T T		T A T G T		A T A C G		T A G A A		T A T T G	
FWD 7. PSCH006	A C C A T		A T T T T		A A A T T		T A T G T		A T A C G		T A G A A		T A T T G	
FWD 8. PSCH007	A C C A T		A T T T T		A A A T T		T A T G T		A T A C G		T A G A A		T A T T G	
FWD 9. PSCH008	A C C A T		A T T T T		A A A T T		T A T G T		A T A C G		T A G A A		T A T T G	
FWD 10. PSCH009	A C C A T		A T T T T		A A A T T		T A T G T		A T A C G		T A G A A		T A T T G	
FWD 11. PSCH011	A C C A T		A T T T T		A A A T T		T A T G T		A T A C G		T A G A A		T A T T G	
FWD 12. PSCH012	A C C A T		A T T T T		A A A T T		T A T G T		A T A C G		T A G A A		T A T T G	
FWD 13. PSCH014	A C C A T		A T T T T		A A A T T		T A T G T		A T A C G		T A G A A		T A T T G	
FWD 14. PSCH015	A C C A T		A T T T T		A A A T T		T A T G T		A T A C G		T A G A A		T A T T G	
FWD 15. PSCH016	A C C A T		A T T T T		A A A T T		T A T G T		A T A C G		T A G A A		T A T T G	
FWD 16. PSCH017	A C C A T		A T T T T		A A A T T		T A T G T		A T A C G		T A G A A		T A T T G	
FWD 17. PSCH018	A C C A T		A T T T T		A A A T T		T A T G T		A T A C G		T A G A A		T A T T G	
FWD 18. PSCH020	A C C A T		A T T T T		A A A T T		T A T G T		A T A C G		T A G A A		T A T T G	
FWD 19. AP001	A C C A T		A T T T T		A A A T T		T A T G T		A T A C G		T A G A A		T A T T G	
FWD 20. AP002	A C C A T		A T T T T		A A A T T		T A T G T		A T A C G		T A G A A		T A T T G	
FWD 21. PA21-11	A C C A T		A T T T T		A A A T T		T A T G T		A T A C G		T A G A A		T A T T G	
FWD 22. PA21-19	A C C A T		A T T T T		A A A T T		T A T G T		A T A C G		T A G A A		T A T T G	
FWD 23. AP2-3	A C C A T		A T T T T		A A A T T		T A T G T		A T A C G		T A G A A		T A T T G	
FWD 24. AP28-3	A C C A T		A T T T T		A A A T T		T A T G T		A T A C G		T A G A A		T A T T G	
FWD 25. AP22-218	A C C A T		A T T T T		A A A T T		T A T G T		A T A C G		T A G A A		T A T T G	
FWD 26. AP22-219	A C C A T		A T T T T		A A A T T		T A T G T		A T A C G		T A G A A		T A T T G	
FWD 27. AP22-221	A C C A T		A T T T T		A A A T T		T A T G T		A T A C G		T A G A A		T A T T G	
FWD 28. PSCH22-222	A C C A T		A T T T T		A A A T T		T A T G T		A T A C G		T A G A A		T A T T G	
FWD 29. AP22-223	A C C A T		A T T T T		A A A T T		T A T G T		A T A C G		T A G A A		T A T T G	
FWD 30. AP22-224	A C C A T		A T T T T		A A A T T		T A T G T		A T A C G		T A G A A		T A T T G	
FWD 31. AP22-225	A C C A T		A T T T T		A A A T T		T A T G T		A T A C G		T A G A A		T A T T G	

Figura 4

Alineamiento múltiple de secuencias de nucleótidos del gen Pfk13 de P. falciparum en las posiciones 553,561,568,574,580 y 675 en estado salvaje de comunidades del distrito Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022

	1,660	1,662	1,664	1,686	1,705	1,707	1,723	1,725	1,741	1,743	2,026	2,028
	1,657	1,659	1,681	1,683	1,702	1,704	1,720	1,722	1,738	1,740	2,023	2,025
1. K13 Reference Translation	A C C G A	A C C G A	T C G T A	T C G T A	G G T G G	G G T G G	C C C T A	C C C T A	G T G T G	G T G T G	A G C T G	A G C T G
	P	P	T	T	V	V	P	P	C	C	A	A
	P553L	P553L	R561H	R561H	V568G	V568G	P574L	P574L	C580Y	C580Y	A675V	A675V
FWD 2. AY108	A C C G A	A C C G A	T C G T A	T C G T A	G G T G G	G G T G G	C C C T A	C C C T A	G T G T G	G T G T G	A G C T G	A G C T G
FWD 3. AY119	A C C G A	A C C G A	T C G T A	T C G T A	G G T G G	G G T G G	C C C T A	C C C T A	G T G T G	G T G T G	A G C T G	A G C T G
FWD 4. AY125	A C C G A	A C C G A	T C G T A	T C G T A	G G T G G	G G T G G	C C C T A	C C C T A	G T G T G	G T G T G	A G C T G	A G C T G
FWD 5. AY209	A C C G A	A C C G A	T C G T A	T C G T A	G G T G G	G G T G G	C C C T A	C C C T A	G T G T G	G T G T G	A G C T G	A G C T G
FWD 6. PSCH004	A C C G A	A C C G A	T C G T A	T C G T A	G G T G G	G G T G G	C C C T A	C C C T A	G T G T G	G T G T G	A G C T G	A G C T G
FWD 7. PSCH006	A C C G A	A C C G A	T C G T A	T C G T A	G G T G G	G G T G G	C C C T A	C C C T A	G T G T G	G T G T G	A G C T G	A G C T G
FWD 8. PSCH007	A C C G A	A C C G A	T C G T A	T C G T A	G G T G G	G G T G G	C C C T A	C C C T A	G T G T G	G T G T G	A G C T G	A G C T G
FWD 9. PSCH008	A C C G A	A C C G A	T C G T A	T C G T A	G G T G G	G G T G G	C C C T A	C C C T A	G T G T G	G T G T G	A G C T G	A G C T G
FWD 10. PSCH009	A C C G A	A C C G A	T C G T A	T C G T A	G G T G G	G G T G G	C C C T A	C C C T A	G T G T G	G T G T G	A G C T G	A G C T G
FWD 11. PSCH011	A C C G A	A C C G A	T C G T A	T C G T A	G G T G G	G G T G G	C C C T A	C C C T A	G T G T G	G T G T G	A G C T G	A G C T G
FWD 12. PSCH012	A C C G A	A C C G A	T C G T A	T C G T A	G G T G G	G G T G G	C C C T A	C C C T A	G T G T G	G T G T G	A G C T G	A G C T G
FWD 13. PSCH014	A C C G A	A C C G A	T C G T A	T C G T A	G G T G G	G G T G G	C C C T A	C C C T A	G T G T G	G T G T G	A G C T G	A G C T G
FWD 14. PSCH015	A C C G A	A C C G A	T C G T A	T C G T A	G G T G G	G G T G G	C C C T A	C C C T A	G T G T G	G T G T G	A G C T G	A G C T G
FWD 15. PSCH016	A C C G A	A C C G A	T C G T A	T C G T A	G G T G G	G G T G G	C C C T A	C C C T A	G T G T G	G T G T G	A G C T G	A G C T G
FWD 16. PSCH017	A C C G A	A C C G A	T C G T A	T C G T A	G G T G G	G G T G G	C C C T A	C C C T A	G T G T G	G T G T G	A G C T G	A G C T G
FWD 17. PSCH018	A C C G A	A C C G A	T C G T A	T C G T A	G G T G G	G G T G G	C C C T A	C C C T A	G T G T G	G T G T G	A G C T G	A G C T G
FWD 18. PSCH020	A C C G A	A C C G A	T C G T A	T C G T A	G G T G G	G G T G G	C C C T A	C C C T A	G T G T G	G T G T G	A G C T G	A G C T G
FWD 19. AP001	A C C G A	A C C G A	T C G T A	T C G T A	G G T G G	G G T G G	C C C T A	C C C T A	G T G T G	G T G T G	A G C T G	A G C T G
FWD 20. AP002	A C C G A	A C C G A	T C G T A	T C G T A	G G T G G	G G T G G	C C C T A	C C C T A	G T G T G	G T G T G	A G C T G	A G C T G
FWD 21. PA21-11	A C C G A	A C C G A	T C G T A	T C G T A	G G T G G	G G T G G	C C C T A	C C C T A	G T G T G	G T G T G	A G C T G	A G C T G
FWD 22. PA21-19	A C C G A	A C C G A	T C G T A	T C G T A	G G T G G	G G T G G	C C C T A	C C C T A	G T G T G	G T G T G	A G C T G	A G C T G
FWD 23. AP2-3	A C C G A	A C C G A	T C G T A	T C G T A	G G T G G	G G T G G	C C C T A	C C C T A	G T G T G	G T G T G	A G C T G	A G C T G
FWD 24. AP28-3	A C C G A	A C C G A	T C G T A	T C G T A	G G T G G	G G T G G	C C C T A	C C C T A	G T G T G	G T G T G	A G C T G	A G C T G
FWD 25. AP22-218	A C C G A	A C C G A	T C G T A	T C G T A	G G T G G	G G T G G	C C C T A	C C C T A	G T G T G	G T G T G	A G C T G	A G C T G
FWD 26. AP22-219	A C C G A	A C C G A	T C G T A	T C G T A	G G T G G	G G T G G	C C C T A	C C C T A	G T G T G	G T G T G	A G C T G	A G C T G
FWD 27. AP22-221	A C C G A	A C C G A	T C G T A	T C G T A	G G T G G	G G T G G	C C C T A	C C C T A	G T G T G	G T G T G	A G C T G	A G C T G
FWD 28. PSCH22-222	A C C G A	A C C G A	T C G T A	T C G T A	G G T G G	G G T G G	C C C T A	C C C T A	G T G T G	G T G T G	A G C T G	A G C T G
FWD 29. AP22-223	A C C G A	A C C G A	T C G T A	T C G T A	G G T G G	G G T G G	C C C T A	C C C T A	G T G T G	G T G T G	A G C T G	A G C T G
FWD 30. AP22-224	A C C G A	A C C G A	T C G T A	T C G T A	G G T G G	G G T G G	C C C T A	C C C T A	G T G T G	G T G T G	A G C T G	A G C T G
FWD 31. AP22-225	A C C G A	A C C G A	T C G T A	T C G T A	G G T G G	G G T G G	C C C T A	C C C T A	G T G T G	G T G T G	A G C T G	A G C T G

b. Identificación de mutaciones mediante el análisis de secuenciación de ADN en el gen *Pfcr*

La evaluación del gen *Pfcr* en las posiciones 72, 73, 74, 75 y 76, para las 30 muestras, evidenció mutaciones en la posición 72, donde la cisteína se sustituye (C-TGT) por serina (S-TCT) y en la posición 76, donde la lisina se sustituye (K-AAA) por treonina (T-ACA); mientras que en las posiciones 73, 74 y 75 no se observaron mutaciones. El 100% de las muestras presentaron el genotipo SVMNT (las letras subrayadas indican mutaciones), están asociados a la resistencia a CQ (Tabla 7).

El alineamiento múltiple de secuencias de nucleótidos del gen *Pfcr* indica mutaciones en los codones 72S y 76T de TGT y AAA salvaje cambió a TCT y ACA, sin embargo, en la posición 74 y 75 presentaban el genotipo salvaje (Figura 5).

Tabla 7

Mutaciones en el gen Pfert, asociados con resistencia a cloroquina de P. falciparum de comunidades de Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022

N°	ID Muestras	Años	SNPs del gen <i>Pfert</i>					Resultado
			72 C/S	73 V	74 M/I	75 N/E	76 K/T	
1	AY108	2019	S	V	M	N	T	Alelo mutante
2	AY119	2019	S	V	M	N	T	Alelo mutante
3	AY125	2019	S	V	M	N	T	Alelo mutante
4	AY209	2019	S	V	M	N	T	Alelo mutante
5	PSCH004	2020	S	V	M	N	T	Alelo mutante
6	PSCH006	2020	S	V	M	N	T	Alelo mutante
7	PSCH007	2020	S	V	M	N	T	Alelo mutante
8	PSCH008	2020	S	V	M	N	T	Alelo mutante
9	PSCH009	2020	S	V	M	N	T	Alelo mutante
10	PSCH011	2020	S	V	M	N	T	Alelo mutante
11	PSCH012	2020	S	V	M	N	T	Alelo mutante
12	PSCH014	2020	S	V	M	N	T	Alelo mutante
13	PSCH015	2020	S	V	M	N	T	Alelo mutante
14	PSCH016	2020	S	V	M	N	T	Alelo mutante
15	PSCH017	2020	S	V	M	N	T	Alelo mutante
16	PSCH018	2020	S	V	M	N	T	Alelo mutante
17	PSCH020	2020	S	V	M	N	T	Alelo mutante
18	AP001	2021	S	V	M	N	T	Alelo mutante
19	AP002	2021	S	V	M	N	T	Alelo mutante
20	PA21-11	2021	S	V	M	N	T	Alelo mutante
21	AP21-19	2021	S	V	M	N	T	Alelo mutante
22	AP2-3	2022	S	V	M	N	T	Alelo mutante
23	AP28-3	2022	S	V	M	N	T	Alelo mutante
24	AP22-218	2022	S	V	M	N	T	Alelo mutante
25	AP22-219	2022	S	V	M	N	T	Alelo mutante
26	AP22-221	2022	S	V	M	N	T	Alelo mutante
27	PSCH22-222	2022	S	V	M	N	T	Alelo mutante
28	AP22-223	2022	S	V	M	N	T	Alelo mutante
29	AP22-224	2022	S	V	M	N	T	Alelo mutante
30	AP22-225	2022	S	V	M	N	T	Alelo mutante

El 100% de las muestras presenta el genotipo SVMNT.

Aminoácidos: C: cisteína, S: serina, M: metionina, I: isoleucina, N: asparagina, E: glutámico, T: treonina, K: lisina, N°: número de muestras. En negrita están los alelos de tipo mutante.

Figura 5

Alineamiento múltiple de secuencias de nucleótidos y aminoácidos del gen *Pfprt* indicando mutaciones en los codones 72S,76T y los codones M74, N75 presentaron genotipos salvajes de *P. falciparum* de comunidades del distrito Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022

	390	393	395	399	401	402	404	405	407	410	420
	388	391	393	397	399	400	402	403	405	408	418
1. CRT REFERENCE ... Frame 2	G T G T A	T G T	G T A	A T G	A A T	A A A	A T T T T T	G C T A A A A			
	S V	C	V	M	N	K	I F	A K			
		C72S		M74I	N75E	K76T					
2. AY108	G T G T A	T C T	G T A	A T G	A A T	A C A	A T T T T T	G C T A A A A			
3. AY119	G T G T A	T C T	G T A	A T G	A A T	A C A	A T T T T T	G C T A A A A			
4. AY125	G T G T A	T C T	G T A	A T G	A A T	A C A	A T T T T T	G C T A A A A			
5. AY209	G T G T A	T C T	G T A	A T G	A A T	A C A	A T T T T T	G C T A A A A			
6. PSCH004	G T G T A	T C T	G T A	A T G	A A T	A C A	A T T T T T	G C T A A A A			
7. PSCH006	G T G T A	T C T	G T A	A T G	A A T	A C A	A T T T T T	G C T A A A A			
8. PSCH007	G T G T A	T C T	G T A	A T G	A A T	A C A	A T T T T T	G C T A A A A			
9. PSCH008	G T G T A	T C T	G T A	A T G	A A T	A C A	A T T T T T	G C T A A A A			
10. PSCH009	G T G T A	T C T	G T A	A T G	A A T	A C A	A T T T T T	G C T A A A A			
11. PSCH011	G T G T A	T C T	G T A	A T G	A A T	A C A	A T T T T T	G C T A A A A			
12. PSCH012	G T G T A	T C T	G T A	A T G	A A T	A C A	A T T T T T	G C T A A A A			
13. PSCH014	G T G T A	T C T	G T A	A T G	A A T	A C A	A T T T T T	G C T A A A A			
14. PSCH015	G T G T A	T C T	G T A	A T G	A A T	A C A	A T T T T T	G C T A A A A			
15. PSCH016	G T G T A	T C T	G T A	A T G	A A T	A C A	A T T T T T	G C T A A A A			
16. PSCH017	G T G T A	T C T	G T A	A T G	A A T	A C A	A T T T T T	G C T A A A A			
17. PSCH018	G T G T A	T C T	G T A	A T G	A A T	A C A	A T T T T T	G C T A A A A			
18. PSCH020	G T G T A	T C T	G T A	A T G	A A T	A C A	A T T T T T	G C T A A A A			
19. AP001	G T G T A	T C T	G T A	A T G	A A T	A C A	A T T T T T	G C T A A A A			
20. AP002	G T G T A	T C T	G T A	A T G	A A T	A C A	A T T T T T	G C T A A A A			
21. PA21-11	G T G T A	T C T	G T A	A T G	A A T	A C A	A T T T T T	G C T A A A A			
22. AP21-19	G T G T A	T C T	G T A	A T G	A A T	A C A	A T T T T T	G C T A A A A			
23. AP2-3	G T G T A	T C T	G T A	A T G	A A T	A C A	A T T T T T	G C T A A A A			
24. AP28-3	G T G T A	T C T	G T A	A T G	A A T	A C A	A T T T T T	G C T A A A A			
25. AP22-218	G T G T A	T C T	G T A	A T G	A A T	A C A	A T T T T T	G C T A A A A			
26. AP22-219	G T G T A	T C T	G T A	A T G	A A T	A C A	A T T T T T	G C T A A A A			
27. AP22-221	G T G T A	T C T	G T A	A T G	A A T	A C A	A T T T T T	G C T A A A A			
28. PSCH22-222	G T G T A	T C T	G T A	A T G	A A T	A C A	A T T T T T	G C T A A A A			
29. AP22-223	G T G T A	T C T	G T A	A T G	A A T	A C A	A T T T T T	G C T A A A A			
30. AP22-224	G T G T A	T C T	G T A	A T G	A A T	A C A	A T T T T T	G C T A A A A			
31. AP22-225	G T G T A	T C T	G T A	A T G	A A T	A C A	A T T T T T	G C T A A A A			

c. Identificación de mutaciones mediante el análisis de secuenciación de ADN en el gen *Pfdhfr* y *Pfdhps*

En el gen *Pfdhfr* se evidenció que el 100% de los aislamientos presentaron mutaciones en las posiciones 16, 50 y 51, con cambio en el codón de valina (V-GTA) a alanina (A-GCA) en la posición 16, cisteína (C-TGT) a arginina (R-CGT) en la posición 50 y asparagina (N-AAT) a isoleucina (I-ATT) en la posición 51 indicando resistencia asociada a pirimetamina. Las posiciones 59, 108 y 164 no presentaron mutaciones (Tabla 8).

El análisis y alineamiento de las secuencias se visualizan en la Figura 6, donde los codones 16, 50 y 51 salvajes GTA, TGT y AAT cambio a GCA, CGT y ATT no se detectó mutación en la posición 59, 108 y 164.

Para el gen *Pfdhps*, también se evidenció 100 % de las muestras presentaron mutaciones en las posiciones 540 y 581 donde hubo cambio en unos de los codones de lisina (K-AAA) a glutamato (E-GAA) y alanina (A-GCG) a glicina (G-GGG), respectivamente. Estos genotipos encontrados están asociados con la resistencia a sulfadoxina. Las posiciones 436, 437 y 613 no presentaron mutaciones (Tabla 8). El 100 % de las muestras presentaron los genotipos ARICSI (las letras subrayadas indican mutaciones) para el gen *Pfdhfr* y SAEGA para el gen *Pfdhps*.

El análisis y alineamiento de las secuencias del gen *Pfdhps* se visualiza en la Figura 7 donde el codón 540 salvaje AAA cambio a GAA y 581 salvaje GCG cambio a GGG, sin embargo, en las posiciones 436, 437 y 613 no se detectó mutaciones.

Tabla 8

Mutaciones en el gen Pfdhps y Pfdhfr de P. falciparum asociados con resistencia a sulfadoxina y pirimetamina de comunidades del distrito Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas durante 2022

N°	ID	Años	SNPs del gen <i>Pfdhfr</i>						SNPs del gen <i>Pfdhps</i>					Resultado
			16	50	51	59	108	164	436	437	540	581	613	
	Muestras		V/ A	C/ R	N/ I	C/ R	S/N	I/L	S/A- F	A/ G	K/E	A/ G	A/S-T	
1	AY108	2019	A	R	I	C	S	I	S	A	E	G	A	Alelo mutante
2	AY119	2019	A	R	I	C	S	I	S	A	E	G	A	Alelo mutante
3	AY125	2019	A	R	I	C	S	I	S	A	E	G	A	Alelo mutante
4	AY209	2019	A	R	I	C	S	I	S	A	E	G	A	Alelo mutante
5	PSCH004	2020	A	R	I	C	S	I	S	A	E	G	A	Alelo mutante
6	PSCH006	2020	A	R	I	C	S	I	S	A	E	G	A	Alelo mutante
7	PSCH007	2020	A	R	I	C	S	I	S	A	E	G	A	Alelo mutante
8	PSCH008	2020	A	R	I	C	S	I	S	A	E	G	A	Alelo mutante
9	PSCH009	2020	A	R	I	C	S	I	S	A	E	G	A	Alelo mutante
10	PSCH011	2020	A	R	I	C	S	I	S	A	E	G	A	Alelo mutante
11	PSCH012	2020	A	R	I	C	S	I	S	A	E	G	A	Alelo mutante
12	PSCH014	2020	A	R	I	C	S	I	S	A	E	G	A	Alelo mutante
13	PSCH015	2020	A	R	I	C	S	I	S	A	E	G	A	Alelo mutante
14	PSCH016	2020	A	R	I	C	S	I	S	A	E	G	A	Alelo mutante
15	PSCH017	2020	A	R	I	C	S	I	S	A	E	G	A	Alelo mutante
16	PSCH018	2020	A	R	I	C	S	I	S	A	E	G	A	Alelo mutante
17	PSCH020	2020	A	R	I	C	S	I	S	A	E	G	A	Alelo mutante
18	AP001	2021	A	R	I	C	S	I	S	A	E	G	A	Alelo mutante
19	AP002	2021	A	R	I	C	S	I	S	A	E	G	A	Alelo mutante
20	PA21-11	2021	A	R	I	C	S	I	S	A	E	G	A	Alelo mutante
21	AP21-19	2021	A	R	I	C	S	I	S	A	E	G	A	Alelo mutante
22	AP2-3	2022	A	R	I	C	S	I	S	A	E	G	A	Alelo mutante
23	AP28-3	2022	A	R	I	C	S	I	S	A	E	G	A	Alelo mutante
24	AP22-218	2022	A	R	I	C	S	I	S	A	E	G	A	Alelo mutante
25	AP22-219	2022	A	R	I	C	S	I	S	A	E	G	A	Alelo mutante
26	AP22-221	2022	A	R	I	C	S	I	S	A	E	G	A	Alelo mutante
27	PSCH22-222	2022	A	R	I	C	S	I	S	A	E	G	A	Alelo mutante
28	AP22-223	2022	A	R	I	C	S	I	S	A	E	G	A	Alelo mutante
29	AP22-224	2022	A	R	I	C	S	I	S	A	E	G	A	Alelo mutante
30	AP22-225	2022	A	R	I	C	S	I	S	A	E	G	A	Alelo mutante

El 100% de las muestras presenta el genotipo ARICSI en el gen *Pf dhfr* y SAEGA en el gen *Pfdhps*. Aminoácidos: V: valina, A: alanina, C: cisteína, R: arginina, N: asparagina, I: isoleucina, S: serina, F: fenilalanina, G: glicina, K: lisina, E: glutámico, T: treonina, N: número de muestras. En negrita están los alelos de tipo mutante.

Figura 6

Alineamiento múltiple de secuencias del gen Pfdhfr de P. falciparum con mutaciones en los codones 16A, 50R,51I y en los codones C59,S108, I164 presentaron genotipos salvajes en comunidades del distrito Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas durante 2022

	392	394	494	496	497	499	500	521	523	677	679	680	836	838
1. DHFR Reference ...	T	G	T	A	T	A	T	T	G	T	A	A	G	C
Translation	V					C	N	C		S			I	
	V16A		C50R		N51I			C59R		S108N			I164L	
FWD 2. AY108	T	G	C	A	T	A	C	G	T	A	T	T	T	A
FWD 3. AY119	T	G	C	A	T	A	C	G	T	A	T	T	T	A
FWD 4. AY125	T	G	C	A	T	A	C	G	T	A	T	T	T	A
FWD 5. AY209	T	G	C	A	T	A	C	G	T	A	T	T	T	A
FWD 6. PSCH004	T	G	C	A	T	A	C	G	T	A	T	T	T	A
FWD 7. PSCH006	T	G	C	A	T	A	C	G	T	A	T	T	T	A
FWD 8. PSCH007	T	G	C	A	T	A	C	G	T	A	T	T	T	A
FWD 9. PSCH008	T	G	C	A	T	A	C	G	T	A	T	T	T	A
FWD 10. PSCH009	T	G	C	A	T	A	C	G	T	A	T	T	T	A
FWD 11. PSCH011	T	G	C	A	T	A	C	G	T	A	T	T	T	A
FWD 12. PSCH012	T	G	C	A	T	A	C	G	T	A	T	T	T	A
FWD 13. PSCH014	T	G	C	A	T	A	C	G	T	A	T	T	T	A
FWD 14. PSCH015	T	G	C	A	T	A	C	G	T	A	T	T	T	A
FWD 15. PSCH016	T	G	C	A	T	A	C	G	T	A	T	T	T	A
FWD 16. PSCH017	T	G	C	A	T	A	C	G	T	A	T	T	T	A
FWD 17. PSCH018	T	G	C	A	T	A	C	G	T	A	T	T	T	A
FWD 18. PSCH020	T	G	C	A	T	A	C	G	T	A	T	T	T	A
FWD 19. AP001	T	G	C	A	T	A	C	G	T	A	T	T	T	A
FWD 20. AP002	T	G	C	A	T	A	C	G	T	A	T	T	T	A
FWD 21. PA21-11	T	G	C	A	T	A	C	G	T	A	T	T	T	A
FWD 22. PA21-19	T	G	C	A	T	A	C	G	T	A	T	T	T	A
FWD 23. AP2-3	T	G	C	A	T	A	C	G	T	A	T	T	T	A
FWD 24. AP28-3	T	G	C	A	T	A	C	G	T	A	T	T	T	A
FWD 25. AP22-218	T	G	C	A	T	A	C	G	T	A	T	T	T	A
FWD 26. AP22-219	T	G	C	A	T	A	C	G	T	A	T	T	T	A
FWD 27. AP22-221	T	G	C	A	T	A	C	G	T	A	T	T	T	A
FWD 28. PSCH22-222	T	G	C	A	T	A	C	G	T	A	T	T	T	A
FWD 29. AP22-223	T	G	C	A	T	A	C	G	T	A	T	T	T	A
FWD 30. AP22-224	T	G	C	A	T	A	C	G	T	A	T	T	T	A
FWD 31. AP22-225	T	G	C	A	T	A	C	G	T	A	T	T	T	A

Figura 7

Alineamiento múltiple de secuencias del gen Pfdhps de P. falciparum con mutación en el codón 540E, 581G y genotipos sensibles en el codón S436, A437, A613 en comunidades del distrito Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022

		285	290	390	392	513	515	609	611
1. DHPS Refere...	Frame 3	T	A G T G C T	T	A A A	T	G C G	T	G C C
			S A		K		A		A
			S436A/F A437G		K540E		A581G		A613S/T
2. AY108	T	A	G T G C T T	T	G A A C	T	G G G A	T	G C C C
3. AY119	T	A	G T G C T T	T	G A A C	T	G G G A	T	G C C C
4. AY125	T	A	G T G C T T	T	G A A C	T	G G G A	T	G C C C
5. AY209	T	A	G T G C T T	T	G A A C	T	G G G A	T	G C C C
6. PSCH004	T	A	G T G C T T	T	G A A C	T	G G G A	T	G C C C
7. PSCH006	T	A	G T G C T T	T	G A A C	T	G G G A	T	G C C C
8. PSCH007	T	A	G T G C T T	T	G A A C	T	G G G A	T	G C C C
9. PSCH008	T	A	G T G C T T	T	G A A C	T	G G G A	T	G C C C
10. PSCH009	T	A	G T G C T T	T	G A A C	T	G G G A	T	G C C C
11. PSCH011	T	A	G T G C T T	T	G A A C	T	G G G A	T	G C C C
12. PSCH012	T	A	G T G C T T	T	G A A C	T	G G G A	T	G C C C
13. PSCH014	T	A	G T G C T T	T	G A A C	T	G G G A	T	G C C C
14. PSCH015	T	A	G T G C T T	T	G A A C	T	G G G A	T	G C C C
15. PSCH016	T	A	G T G C T T	T	G A A C	T	G G G A	T	G C C C
16. PSCH017	T	A	G T G C T T	T	G A A C	T	G G G A	T	G C C C
17. PSCH018	T	A	G T G C T T	T	G A A C	T	G G G A	T	G C C C
18. PSCH020	T	A	G T G C T T	T	G A A C	T	G G G A	T	G C C C
19. AP001	T	A	G T G C T T	T	G A A C	T	G G G A	T	G C C C
20. AP002	T	A	G T G C T T	T	G A A C	T	G G G A	T	G C C C
21. PA21-11	T	A	G T G C T T	T	G A A C	T	G G G A	T	G C C C
22. PA21-19	T	A	G T G C T T	T	G A A C	T	G G G A	T	G C C C
23. AP2-3	T	A	G T G C T T	T	G A A C	T	G G G A	T	G C C C
24. AP28-3	T	A	G T G C T T	T	G A A C	T	G G G A	T	G C C C
25. AP22-218	T	A	G T G C T T	T	G A A C	T	G G G A	T	G C C C
26. AP22-219	T	A	G T G C T T	T	G A A C	T	G G G A	T	G C C C
27. AP22-221	T	A	G T G C T T	T	G A A C	T	G G G A	T	G C C C
28. PSCH22-222	T	A	G T G C T T	T	G A A C	T	G G G A	T	G C C C
29. AP22-223	T	A	G T G C T T	T	G A A C	T	G G G A	T	G C C C
30. AP22-224	T	A	G T G C T T	T	G A A C	T	G G G A	T	G C C C
31. AP22-225	T	A	G T G C T T	T	G A A C	T	G G G A	T	G C C C

d. Identificación de mutaciones por secuenciamiento de ADN del gen *Pfmdr1*

Se observó 100% de las muestras presentaron mutaciones en la posición 184, donde presentaron una sustitución de tirosina (Y-TAT) a fenilalanina (F-TTT), mientras que en la posición 86 mostraron genotipo salvaje (Tabla 9). El 100 % de las muestras presentaron los genotipos NF (la letra subrayada indica mutación). En la figura 8 se observa el análisis y alineamiento de las secuencias, donde la posición 184 salvaje TAT cambio a TTT.

Tabla 9

Mutaciones del gen Pfmdr1 de P. falciparum asociado a resistencia de mefloquina y cloroquina en comunidades del distrito Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022

Nº	ID Muestras	SNPs del gen <i>Pfmdr1</i>			Resultado
		Años	86 N/Y	184 Y/F	
1	AY108	2019	N	F	Alelo mutante
2	AY119	2019	N	F	Alelo mutante
3	AY125	2019	N	F	Alelo mutante
4	AY209	2019	N	F	Alelo mutante
5	PSCH004	2020	N	F	Alelo mutante
6	PSCH006	2020	N	F	Alelo mutante
7	PSCH007	2020	N	F	Alelo mutante
8	PSCH008	2020	N	F	Alelo mutante
9	PSCH009	2020	N	F	Alelo mutante
10	PSCH011	2020	N	F	Alelo mutante
11	PSCH012	2020	N	F	Alelo mutante
12	PSCH014	2020	N	F	Alelo mutante
13	PSCH015	2020	N	F	Alelo mutante
14	PSCH016	2020	N	F	Alelo mutante
15	PSCH017	2020	N	F	Alelo mutante
16	PSCH018	2020	N	F	Alelo mutante
17	PSCH020	2020	N	F	Alelo mutante
18	AP001	2021	N	F	Alelo mutante
19	AP002	2021	N	F	Alelo mutante
20	PA21-11	2021	N	F	Alelo mutante
21	AP21-19	2021	N	F	Alelo mutante
22	AP2-3	2022	N	F	Alelo mutante
23	AP28-3	2022	N	F	Alelo mutante
24	AP22-218	2022	N	F	Alelo mutante
25	AP22-219	2022	N	F	Alelo mutante
26	AP22-221	2022	N	F	Alelo mutante
27	PSCH22-222	2022	N	F	Alelo mutante
28	AP22-223	2022	N	F	Alelo mutante
29	AP22-224	2022	N	F	Alelo mutante
30	AP22-225	2022	N	F	Alelo mutante

El 100% de las muestras presenta el genotipo NF.

Aminoácidos: N: asparagina, Y: tirosina, S: serina, F: fenilalanina, N°: número de muestras. En negrita están los alelos de tipo mutante.

Figure 8

Alineamiento múltiple del gen *Pfmdr1* de *P. falciparum* con mutación en el codón 184F y el genotipo sensible en el codón N86 en muestras de comunidades del distrito Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022

	270						274			276			550						552		
	270						274			276			550						552		
1. PFMDR1 Reference Frame 1	T	G	A	T	A	T	A	A	T	C	C	T	G	G	T	T	T	A	T	A	T
			D		I			N			P		G	G		L			Y		W
								N86Y											Y184F		
2. AY108	T	G	A	T	A	T	T	A	A	T	C	C	T	G	G	T	T	T	A	T	T
3. AY119	T	G	A	T	A	T	T	A	A	T	C	C	T	G	G	T	T	T	A	T	T
4. AY125	T	G	A	T	A	T	T	A	A	T	C	C	T	G	G	T	T	T	A	T	T
5. AY209	T	G	A	T	A	T	T	A	A	T	C	C	T	G	G	T	T	T	A	T	T
6. PSCH004	T	G	A	T	A	T	T	A	A	T	C	C	T	G	G	T	T	T	A	T	T
7. PSCH006	T	G	A	T	A	T	T	A	A	T	C	C	T	G	G	T	T	T	A	T	T
8. PSCH007	T	G	A	T	A	T	T	A	A	T	C	C	T	G	G	T	T	T	A	T	T
9. PSCH008	T	G	A	T	A	T	T	A	A	T	C	C	T	G	G	T	T	T	A	T	T
10. PSCH009	T	G	A	T	A	T	T	A	A	T	C	C	T	G	G	T	T	T	A	T	T
11. PSCH011	T	G	A	T	A	T	T	A	A	T	C	C	T	G	G	T	T	T	A	T	T
12. PSCH012	T	G	A	T	A	T	T	A	A	T	C	C	T	G	G	T	T	T	A	T	T
13. PSCH014	T	G	A	T	A	T	T	A	A	T	C	C	T	G	G	T	T	T	A	T	T
14. PSCH015	T	G	A	T	A	T	T	A	A	T	C	C	T	G	G	T	T	T	A	T	T
15. PSCH016	T	G	A	T	A	T	T	A	A	T	C	C	T	G	G	T	T	T	A	T	T
16. PSCH017	T	G	A	T	A	T	T	A	A	T	C	C	T	G	G	T	T	T	A	T	T
17. PSCH018	T	G	A	T	A	T	T	A	A	T	C	C	T	G	G	T	T	T	A	T	T
18. PSCH020	T	G	A	T	A	T	T	A	A	T	C	C	T	G	G	T	T	T	A	T	T
19. AP001	T	G	A	T	A	T	T	A	A	T	C	C	T	G	G	T	T	T	A	T	T
20. AP002	T	G	A	T	A	T	T	A	A	T	C	C	T	G	G	T	T	T	A	T	T
21. PA21-11	T	G	A	T	A	T	T	A	A	T	C	C	T	G	G	T	T	T	A	T	T
22. AP21-19	T	G	A	T	A	T	T	A	A	T	C	C	T	G	G	T	T	T	A	T	T
23. AP2-3	T	G	A	T	A	T	T	A	A	T	C	C	T	G	G	T	T	T	A	T	T
24. AP28-3	T	G	A	T	A	T	T	A	A	T	C	C	T	G	G	T	T	T	A	T	T
25. AP22-218	T	G	A	T	A	T	T	A	A	T	C	C	T	G	G	T	T	T	A	T	T
26. AP22-219	T	G	A	T	A	T	T	A	A	T	C	C	T	G	G	T	T	T	A	T	T
27. AP22-221	T	G	A	T	A	T	T	A	A	T	C	C	T	G	G	T	T	T	A	T	T
28. PSCH22-222	T	G	A	T	A	T	T	A	A	T	C	C	T	G	G	T	T	T	A	T	T
29. AP22-223	T	G	A	T	A	T	T	A	A	T	C	C	T	G	G	T	T	T	A	T	T
30. AP22-224	T	G	A	T	A	T	T	A	A	T	C	C	T	G	G	T	T	T	A	T	T
31. AP22-225	T	G	A	T	A	T	T	A	A	T	C	C	T	G	G	T	T	T	A	T	T

Los genotipos encontrados en este estudio fueron: Para el gen *Pfcr* se observó en la mayoría de las muestras el genotipo **SVMNT** (las letras negritas indica mutación), en el gen *Pfdhfr* y *Pfdhps*, presentaron los genotipos **ARICSI** y **SAEGA** para todas las muestras; respectivamente. Para el gen *Pfmdr1* solo se encontró un genotipo mutante **NF**, estos genotipos son más comunes encontrado en 1999, 2006, 2007 y 2022 en la Amazonia peruana. Sin embargo, presentaron el mismo genotipo sensible PFNMYRIPRVPCA para el gen *Pfk13*.

Estos resultados se pueden visualizar en la tabla 4, sobre el genotipo circulante de *P. falciparum* asociada a la resistencia a los antimaláricos en el Perú.

Tabla 10

Genotipos circulantes de P. falciparum asociada a resistencia a los antimaláricos en muestras de comunidades del distrito Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022

<i>Genes</i>	<i>Pfcr</i>					<i>Pfdhps</i>					<i>Pfdhfr</i>						<i>Pfmdr1</i>	
Posiciones	C72S	V73	M74I	N75E	K76T	S436A	A437G	K540E	A581G	A613S	V16A	C50R	N51I	C59R	S108N	I164L	N86Y	Y184F
3D7 (Cepa salvaje)	C	V	M	N	K	S	A	K	A	A	V	C	N	C	S	I	N	Y
Amazonas 2019-2022	S	V	M	N	T	S	A	E	G	A	A	R	I	C	S	I	N	F

Aminoácidos: C: cisteína, S: serina, V: valina, M: metionina, I: isoleucina, N: asparagina, E: glutámico, T: treonina, K: lisina, A: alanina, R: arginina, I: isoleucina, F: fenilalanina, G: glicina, L: leucina, Y: tirosina. En negrita están los alelos de tipo mutante.

IV. DISCUSIÓN

La resistencia a los fármacos antipalúdicos continúa dificultando la eliminación y control efectivo de la malaria en la mayoría de países endémicos, por lo tanto, es imprescindible llevar a cabo una vigilancia periódica de *P. falciparum* a fin de evaluar la efectividad del tratamiento; así como también, evaluar las mutaciones en genes relacionados a resistencia a la artemisinina, cloroquina, sulfadoxina, pirimetamina y mefloquina.

En el estudio, todas las muestras analizadas para el gen *Pfcr*t presentaron mutación C72S y K76T fuertemente relacionada a resistencia a cloroquina. Similares resultados informaron Arróspide et al., 2014 en Esmeralda y Machala, donde observaron presencia del mutante K76T por PCR-RFLP. También es consistente con el estudio en Colombia donde genotiparon 257 muestras positivas para *P. falciparum*, determinando que la mayoría presentaban mutantes dobles (75E y 76T) y triples (74I, 75E y 76T) y además de un genotipo sensible (Chenet, Taylor, Blair, Zuluaga y Escalante, 2015). Otra investigación, en Ecuador, mostró la fijación de haplotipos CVMNT, CVMET y SVMNT en *Pfcr*t resistente, donde los genotipos circulaban en Colombia, Perú y Brasil, por lo que se sugieren que los parásitos portadores de estos haplotipos, estuvieron circulando primero en Colombia, luego cruzaron a Ecuador y posteriormente entraron a Perú (Valenzuela et al., 2019).

Por otro lado, en Guyana Francesa, los análisis el gen *Pfcr*t mostraron el haplotipo SMNVT con mutación del alelo 76T y un haplotipo C350R, sensible a la cloroquina, lo que podría relacionarse a la reversión de la resistencia a este antimalárico. Aunque en este estudio se mostró resultados diferentes, podemos decir que, este alelo es una herramienta adecuada para la caracterización de parásitos sensibles a la cloroquina (Pelleau et al., 2015). Así mismo, otro estudio realizado por secuenciación de nueva generación en 16 muestras, mostró la presencia del haplotipo SVMNT en cuatro muestras, concluyendo que tres de estas muestras fueron casos importados de África y un caso local proveniente de la región de Choluteca, Honduras (Valdivia et al., 2020).

En la Isla Gran Comora, tras la retirada de la cloroquina, se realizaron investigaciones similares en un total de 207 muestras de aislados clínicos de *P. falciparum*; en donde, se observó una reversión sustancial del fenotipo mutante a salvajes, indicando

drásticamente que los aislados de *P. falciparum* sensibles a cloroquina (CQ) habían surgido tras la retirada de este fármaco (Huang et al., 2016).

En muestras de países africanos como Camerún, tras 15 años después del cambio de la política de tratamiento de CQ a una combinación basada en artemisinina, se observó una alta prevalencia del genotipo de tipo salvaje *Pfcr* K76, este hallazgo concuerda con estudios anteriores que informaron de la circulación de cepas sensibles a la cloroquina, esto plantea que el retorno de la sensibilidad a la cloroquina puede no ser similar en todo el mundo, posiblemente debido al diferente uso de drogas (Tuedom et al., 2021). Sin embargo, la evaluación de mutaciones en el gen *Pfcr*, es esencial para monitorear cambios en el perfil molecular que puede conducir a la reversión de la resistencia a la cloroquina después de la suspensión del fármaco como ocurrió en Malawi, donde un estudio de análisis de diversidad de microsatélites que rodean al gen *Pfcr* determinaron la susceptibilidad a CQ, que fue causado por una expansión nuevamente de haplotipo wild type (Petersen et al., 2015).

Los análisis del gen *Pfdhfr* revelaron la ausencia del mutante en el genotipo C59R, S108N/T y I164L, pero elevada frecuencia de mutaciones en los genotipos A16V, C50R y N51I. En el gen *Pfdhps*, observaron alta frecuencia de mutantes en los codones K540E y A581G. Estos hallazgos concuerdan con informes de Tumbes (Perú) donde pacientes febriles acudían en busca de atención médica donde encontraron el genotipo triple mutante de *Pfdhfr* (50R, 51I y 108N) presente fuera del Perú por tanto el genotipo indicaría haber sido introducido durante o después del periodo de transmisión de malaria del 2006 (Baldeviano et al., 2015). Por otro lado, en muestras de Loreto-Perú, estuvo presente un 98% de mutaciones cuádruples asociados a resistencia SP (51I/108N + 437G/540E) asociado con fracaso de tratamiento, dicho linaje aumento en los casos de *P. falciparum* en el norte peruano entre 2012 y 2014, así como en Cusco en el 2013, este hallazgo sugiere que podría haber sido introducido desde Brasil o Bolivia donde se describieron inicialmente (Villena et al., 2022).

Un estudio realizado en tres sitios Centinela de Somalia, informaron alta frecuencia de mutaciones triples N51I/C59R/S108N y mutaciones dobles A437G/K540E, indicando que la prevalencia de mutaciones aumenta debido a la presión farmacológica y al uso no oficial como monoterapia de sulfadoxina-pirimetamina (Warsame et al., 2015). Por otro

lado, al comparar los haplotipos encontrados en noroeste de Colombia, evidencia aparición lenta de mutaciones en *Pfdhps* y *Pfdhfr*, que podría explicarse debido al uso de diversos regímenes de SP en combinación con CQ o AQ, por el cual esto contrasta con lo que sucedió en Brasil y la región amazónica peruana, donde se utilizó principalmente la terapia con SP y donde predominan parásitos con mutaciones dobles o triples (Guerras et al., 2022).

La frecuencia de genotipos en *Pfmdr1*, 86Y y 184F, se asocian con mayor resistencia a Mefloquina (MQ), lumefantrina (LUM), cloroquina (CQ), quinina (QN) y amodiaquina (AQ), asimismo se ha reportado estudios epidemiológicos que investigan la prevalencia e implicaciones de *Pfmdr1* en distintas partes del mundo, señalando que estas mutaciones, están restringidas geográficamente y su distribución varía de una región a otra (Adamu et al., 2020). En muestras de mujeres embarazadas y en niños de lagos de Nigeria, se han encontrado las mutaciones 86Y y 184F, dichos resultados coinciden con estudios en Gambia y Kenia, donde los codones mutantes están en relación a la presión de amodiaquina (Ikegbunam et al., 2019).

Además, se han realizado diferentes estudios que han identificado diversas mutaciones en *Pfmdr1*, como el estudio Escobar et al., 2020, que informaron mutaciones simples, triples y cuádruples en muestras de casos importados de Chile, como la mutación 86Y y 1246Y, que son frecuentes en África, y que se ha relacionado a una disminución en la eficacia de cloroquina y amodiaquina, al mismo tiempo se ha evidencia un aumento de sensibilidad a la lumefantrina, mefloquina y a las artemisininas. Otras investigaciones sugieren que la resistencia a la cloroquina, que es mediada por mutaciones en el gen *Pfcr*, está modulada por mutaciones en *Pfmdr1*, y señalan que los alelos mutantes 86Y y 184F son los más destacados (Antony, Das, Parija y Padhi, 2016).

De acuerdo con la información disponible por trabajos ya publicados, en las muestras analizadas en Centroamérica, Haití y América del Sur, se ha observado la presencia del alelo mutante 184F, dicha mutación se cree que tiene un efecto limitado en ausencia de una mutación en el codón 86 (Valenzuela et al., 2019 y Veiga et al., 2016). Sin embargo, un estudio publicado sobre las mutaciones de este gen, analizaron los codones 86,184,1034,1042 y 1246 en muestras de Honduras que coinciden con los resultados de este estudio, mostraron alelos de tipo salvaje en las posiciones 86 y 1246, y alelos mutantes en

184,1034 y 1042 (Fontecha et al., 2021). Asimismo, en estudio realizado en Punta Cana, Republica Dominicana en seis pacientes infectados por *P. falciparum*, se encontraron mutaciones solo en el codón 184 (Chenet et al., 2017).

En la actualidad el principal tratamiento contra la malaria por *P. falciparum*, es la terapia combinada con artemisinina, que es un medicamento utilizado principalmente en países endémicos, se enfrenta a un desafío creciente debido a la resistencia emergente en África y Asia Tropical, esta resistencia plantea un problema significativo para el tratamiento (Yasri y Wiwanitkit, 2021). En América del Sur se ha reportado la presencia de un genotipo resistente C580Y en *Pfk13* en Guyana (Chenet et al., 2016), este genotipo resistente aún no se ha reportado en otros países de Latinoamérica (Valenzuela *et al*, 2019). Otro estudio reciente realizado en las cuencas del Amazonas Brasileño, evaluó los polimorfismos en el dominio de la hélice del gen *Pfk13*, cuyos resultados demostraron que no se encontraron evidencias de polimorfismos relacionados con la resistencia a la artemisinina, determinado que sus resultados respaldan a seguir utilizando el uso de la terapia combinada basada en artemisinina (ACT) en la región de Brasil (Inoue et al., 2018).

En países de Ecuador, Colombia, Perú e incluso la cuenca de la amazonia brasileña, han analizados las posiciones 476, 493, 539, 543 y 580 para el gen *Pfk13*, obteniendo como resultados ausencia de mutaciones en el gen *K13* y determinando así el uso continuo del tratamiento de ACT (Mathieu et al., 2020 y Gomes et al., 2018). Sin embargo, un estudio reciente en el Perú, sobre secuenciación altamente multiplexado (Pf AmpliSeq), basándose en 13 genes que confieren resistencia a antimaláricos, incluyendo el análisis del Gen K13, dio como resultado que en las muestras estudiadas había polimorfismos de baja frecuencia que no se asocian a resistencia a artemisinina, lo que sugiere que la resistencia a la artemisinina no ha estado presente en los últimos años (Kattenberg et al., 2023).

En general, las frecuencias de los genotipos mutantes en el Perú se ha encontrado dos genotipos comunes desde el año 1999 a 2022 para el gen *Pfcrt*, el genotipo CVMNT y SVMNT (las letras negritas indica mutaciones) que se observado en Padre Cocha y Caballococha en 1999, así como en Iquitos en 2006-2007 (Bacon et al., 2009). Entre 2019 al 2022, ha presentado el genotipo SVMNT que confiere alta resistencia en *P. falciparum* que ha alcanzado la fijación en la Amazonia peruana, este hallazgo encontrado en Amazonas

respalda a trabajos anteriores presentados en el Perú, Brasil, Ecuador y Colombia. A pesar del continuó uso de Cloroquina para tratar la infección causa por *P. vivax* en esta región, hasta el momento se ha observado la fijación de estos genotipos (Villena et al., 2022).

Los genotipos mutantes para *Pfdhfr* y *Pfdhps*, fueron **CINL**, **CNNI**, **RINI** y **SGEGA** respectivamente, entre los años 1999-2012, encontrados en Padre Cocha e Iquitos presentando los mismos genotipos para todas las muestras (Bacon et al., 2009). Estos genotipos **RINI** y **SGEGA** fueron reportados en Tumbes, aparentemente fue introducido en el Perú durante o después del brote de la malaria en el país, que fueron reportados por primera vez en el año 2006 (Baldeviano 2015). Sin embargo, entre el 2021-2022, se ha reportado genotipos triples mutantes como **ARICSI**, **VCICNI** y **SAEGA**, **SGEAA**, en muestras de Loreto, estas mutaciones se asocian con el fracaso del tratamiento, dichas mutaciones aumento en los casos de *P. falciparum* en el norte peruano entre 2012 y 2014, así como en Cusco en el 2013, este hallazgo sugiere que podría haber sido introducido desde Brasil o Bolivia donde se describieron inicialmente (Villena et al., 2022). Para el gen *Pfmdr1* implicado en la resistencia a MQ, los resultados de este estudio han demostrado la presencia de un mismo genotipo mutante **NF**, estos resultados son muy similares a los genotipos encontrados en Venezuela, en el sur de Bolivia y Brasil, estas mutaciones tienen origen común en Amazonas; sin embargo, se requiere datos adicionales a nivel de población para analizar el origen único de estos genotipos (Kattenberg et al., 2023).

Estos hallazgos están en concordancia con los resultados obtenidos en el estudio actual, lo cual nos brinda una perspectiva más amplia sobre los parásitos de *P. falciparum* que circulan en las comunidades del distrito Río Santiago, provincia de Condorcanqui, a pesar de que no se detectaron mutaciones en el gen K 13 asociada a resistencia a la artemisinina en las muestras analizadas, no se puede descartar la posibilidad de que otras mutaciones relacionadas con la resistencia a este fármaco están propagándose. Además, se han llevado a cabo investigaciones a nivel de población mediante el análisis de genomas y transcriptomas, lo que ha permitido identificar diversas regiones genómicas y genes con expresión diferencial que podrían estar relacionados con la resistencia a los derivados de la artemisinina o a los fármacos asociados (Oberstaller et al., 2021).

Es de suma importancia monitorear adecuadamente el cumplimiento terapéutico de los pacientes, dado que la aparente ineficacia de un medicamento puede derivar de un

tratamiento incompleto. Además, el parásito posee una capacidad genómica que le permite adaptarse rápidamente, lo que puede dar lugar al resultado de resistencia relacionado a medicamentos antimaláricos (Villena et al., 2022).

En Perú se ha establecido, el Plan de eliminación de la malaria con vigencia durante el periodo 2022-2030, el cual tiene como meta llevar a cabo actividades destinadas a eliminar la malaria mediante la implementación de un plan que se centra en la participación comunitaria (MINSA, 2022). Por lo tanto, resulta importante implementar sistemas de vigilancia en áreas endémicas para detectar de forma temprana la resistencia a los medicamentos, en este contexto, la comprensión de la vigilancia molecular de los antimaláricos en *P. falciparum* proporciona información relevante para respaldar el programa de la erradicación de la malaria en Perú. Finalmente, este estudio evidencia la importancia de las investigaciones moleculares como herramientas de vigilancia para el control y erradicación de la malaria en nuestro país.

V. CONCLUSIONES

1. La PCR en tiempo real permitió realizar la confirmación molecular de manera eficiente, verificando la presencia de *P. falciparum* en muestras provenientes de comunidades del distrito Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022.
2. En las muestras obtenidas de las comunidades del distrito de Río Santiago, se evidencia la circulación de *P. falciparum* con genotipo resistente a Cloroquina, Sulfadoxina, Pirimetamina y Mefloquina, más no a artemisinina.
3. Todas las muestras presentaron el mismo genotipo PFNMYRIPRVPCA para el gen *Pfk13*, SVMNT para el gen *Pfcrt*, ARICSI en el gen *Pfdhfr* y SAEGA en el gen *Pfdhps* y NF en el gen *Pfmdr1*, lo cual es consistente con una reciente introducción y posterior expansión clonal.

VI. RECOMENDACIONES

- 1) Incorporar la confirmación molecular para muestras con baja densidad parasitaria y/o pacientes asintomáticos.
- 2) Establecer la vigilancia molecular para resistencia a antimaláricos, con el fin de mitigar el riesgo de infección por *P. falciparum* resistente.
- 3) Ampliar investigaciones de secuenciamiento con una mayor cantidad de muestras para identificar posibles apariciones de resistencia a medicamentos antimaláricos en las diferentes especies de *Plasmodium* spp. en la región Amazonas.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamu, A., Mahmoud J., Hauwa, H., Bassa, Y., Mohammed, I., Balogun, E. & Mohammed, M. (2020). *Plasmodium falciparum* multidrug resistance gene-1 polymorphisms in Northern Nigeria: implications for the continued use of artemether-lumefantrine in the region. *Malaria Journal*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12936-020-03506-z>
- Alcántara, M. (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. *Ecología molecular*, 18(1), 541-566.
- Al Mekhlafi, H., Madkhali, A., Abdulhaq, A., Atroosh, W., Ghzwani, A., Zain, K. & Lau, Y. (2022). Polymorphism analysis of *pfmdr1* gene in *Plasmodium falciparum* isolates 11 years post-adoption of artemisinin-based combination therapy in Saudi Arabia. *Scientific Reports*, 12(1), 517. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04450-x>
- Aramburú, J., Ramal, C., & Witzig, R. (1999). Malaria reemergence in the Peruvian Amazon region. *Emerging infectious diseases*, 5(2), 209–215. <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/14808>
- Arróspide, N., Guerra, H., Mora, G., Cortez, D., Pérez, C., Veloz, R., Gutiérrez, S., & Cabezas, C. (2014). Alelos mutantes asociados a la resistencia a cloroquina y sulfadoxina-pirimetamina en *Plasmodium falciparum* de las fronteras Ecuador-Perú y Ecuador-Colombia. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*, 31(2), 282–287. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2014.312.47>
- Ashley, A., Dhorda, M., Fairhurst, R., Amaratunga, C., Lim, P., Suon, S., Sreng, S. & Runcharoen, R. (2014). Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *The New England journal of medicine*, 371(5), 411–423. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1314981>
- Antony, A., Das, S., Parija, C., & Padhi, S. (2016). Sequence analysis of *Pfcr* and *pfmdr1* genes and its association with chloroquine resistance in Southeast Indian *Plasmodium falciparum* isolates. *Genomics data*, 8, 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2016.04.010>
- Bacon, D., McCollum, A., Griffing, S., Salas, C., Soberon, V., Santolalla, M., Haley, R., Tsukayama, P., Lucas, C., Escalante, A., & Udhayakumar, V. (2009). Dynamics of malaria drug resistance patterns in the Amazon basin region following changes in Peruvian national treatment policy for uncomplicated malaria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(5), 2042–2051. <https://doi.org/10.1128/AAC.01677-08>

- Baldeviano, C., Akinyi, S., Arróspide, N., González, R., Sánchez, J., Macedo, S., Conde, S., Tapia, T., Salas, C., Gamboa, D., Herrera, Y., Edgel, K., Udhayakumar, L. y Lescano, A. (2015). Molecular Epidemiology of *Plasmodium falciparum* Malaria Outbreak, Tumbes, Peru, 2010–2012. *Emerging Infectious Diseases*, 21(5). <https://doi.org/10.3201/eid2105.141427>
- Baraka, V., Ishengoma, D., Fransis, F., Minja, D., Madebe, R., Ngatunga, D. & Geertruyden, J. (2015). High-level *Plasmodium falciparum* sulfadoxine-pyrimethamine resistance with the concomitant occurrence of septuple haplotype in Tanzania. *Malar Journal*, 14 (439). <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0977-8>
- Berzosa, P., Esteban, A., García, L., González, V., Navarro, M., Fernández, T., Romay, M., Herrador, Z., Rubio, M., Ncogo, P., Santana, M., Valladares, B., Riloha, M., & Benito, A. (2017). Profile of molecular mutations in *Pfdhfr*, *Pfdhps*, *Pfmdr1*, and *Pfcrtr* genes of *Plasmodium falciparum* related to resistance to different anti-malarial drugs in the Bata District (Equatorial Guinea). *Malaria Journal*, 16 (1), 28. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1672-0>
- Bustamante, T. (2019). Epidemiological characterization of malaria transmission in indigenous communities in the department of Amazonas. 2009-2019. *Revista del Cuerpo Médico Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo*, 12 (4), 325-331. <https://doi.org/10.35434/rcmhnaaa.2019.124.567>
- Bloland, P. (2021). *Drug resistance in malaria*. World Health Organization, Geneva, 2001. https://www.cdc.gov/malaria/resources/pdf/drug_resistance/bloland_who2001.pdf
- Campuzano, G. y Blair, S. (2010). Malaria: consideraciones sobre su diagnóstico. *Medicina & Laboratorio*; 16 (81): 311-354. <https://medicinaylaboratorio.com/index.php/myl/article/view/392>
- Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades (2022) – Minsa. SE 23 - 2022. <http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/5853.pdf>
- Chenet, S., Akinyi, S., Huber, C., Chandrabose, J., Lucchi, N., Talundzic, E., Krishnalall, K., Ceron, N., Musset, L., Macedo, A., Venkatesan, M., Rahman, R., Barnwell, J., & Udhayakumar, V. (2016). Independent emergence of the *Plasmodium falciparum* Kelch propeller domain mutant allele C580Y in Guyana. *The Journal of Infectious Diseases*, 213(9), 1472–1475. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv752>
- Chenet, S., Taylor, J., Blair, S., Zuluaga, L., & Escalante, A. (2015). Longitudinal analysis of *Plasmodium falciparum* genetic variation in Turbo, Colombia: implications for

- malaria control and elimination. *Malaria Journal*, 14(1), 363. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0887-9>
- Diz, O. (2020). Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *NPunto*, 3(30):88-111. <https://www.npunto.es/revista/30/tecnicas-de-biologia-molecular-en-el-diagnostico-de-enfermedades-infecciosas>
- Durand, S., La chira, A. y Cabezas C. (2017). Impacto de diferentes esquemas terapéuticos sobre la malaria en la costa y amazonía peruana, en el marco de una política de medicamentos antimaláricos, 1994-2017. *Revista Peruana de Medicina Experimental en Salud Pública*, 35(3):497-504. <http://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2018.353.3891>
- Escalante, A. & Pacheco, M. (2019). Malaria molecular epidemiology: an evolutionary genetics perspective. *Microbiol Spectrum* 7(4): AME-0010-2019. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ame-0010-2019>
- Escobar, D., Lucchi, N., Abdallah, R., Valenzuela, M., Udhayakumar, V., Jercic, M., & Chenet, S. (2020). Molecular and epidemiological characterization of imported malaria cases in Chile. *Malaria Journal*, 19(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/s12936-020-03353-y>
- Feng, J., Dongemei, X., Xiangli, K., Kangming, L. & Zhigui, X. (2021) Characterization of *Pfmdr1*, *Pfcrt*, *PfK13*, *Pfubp1*, and *Pfap2mu* in Travelers Returning from Africa with *Plasmodium falciparum* Infections Reported in China from 2014 to 2018. *American Society for Microbiology* (1098-6596). <https://doi.org/10.1128/aac.02717-20>
- Fontecha, G., Pinto, A., Archaga, O., Betancourth, S., Escobar, L., Henríquez, J., Valdivia, H., Montoya, A., & Mejía, R. (2021). Assessment of *Plasmodium falciparum* anti-malarial drug resistance markers in *Pfcrt* and *Pfmdr1* genes in isolates from Honduras and Nicaragua, 2018-2021. *Malaria Journal*, 20(1), 465. <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03977-8>
- Galindo, A., Cristiano, F., Knudson, A., Nicholls, R. & Guerra, Á. (2010). Mutaciones puntuales en los genes dhfr y dhps de *Plasmodium falciparum* de tres regiones endémicas. *Biomédica: Revista Del Instituto Nacional de Salud*, 30(1), 56. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v30i1.153>
- Gomes, L., Lavigne, A., Peterka, L., Brasil, P., Ménard, D., Ribeiro, C. & Ferreira-M. (2018). Absence of K13 polymorphism in *Plasmodium falciparum* from Brazilian

- areas where the parasite is endemic. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(10). <https://doi.org/10.1128/aac.00354-18>
- Guerra, A., Olivera, M., Cortés, L., Chenet, S., Macedo, A., & Lucchi, N. (2022). Molecular surveillance for anti-malarial drug resistance and genetic diversity of *Plasmodium falciparum* after chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine withdrawal in Quibdo, Colombia, 2018. *Malaria Journal*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12936-022-04328-x>
- Griffing, S., Syphard, L., Sridaran, S., McCollum, A., Mixson, T., Vinayak, S., Villegas, L., Barnwell, J., Escalante, A., & Udhayakumar, V. (2010). pfmdr1 amplification and fixation of pfcr1 chloroquine resistance alleles in Plasmodium falciparum in Venezuela. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(4), 1572–1579. <https://doi.org/10.1128/aac.01243-09>
- Hernández, S., Chuprine, K. y Carrillo, A. (2020). Actualización de malaria. *Revista Médica Sinergia*, 5(12). <https://doi.org/10.31434/rms.v5i12.616>
- Hodoamed, P. (2021). *P. falciparum* and Its Molecular Markers of Resistance to Antimalarial Drugs. *Reviewed chapter*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.98372>
- Huang, B., Wang, Q., Deng, C. ... & Song, J. (2016). Prevalence of crt and mdr-1 mutations in Plasmodium falciparum isolates from Grande Comore Island after withdrawal of chloroquine. *Malaria Journal* 15, 414. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1474-4>
- Ikegbunam, M., Nkonganyi, N., Thomas, B., Esimone, C., Velavan, T., & Ojurongbe, O. (2019). Analysis of Plasmodium falciparum Pfcr1 and Pfmdr1 genes in parasite isolates from asymptomatic individuals in Southeast Nigeria 11 years after withdrawal of chloroquine. *Malaria Journal*, 18(1), 343. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2977-6>
- Inoue, J., Jovel, I., Morris, U., Aydin-Schmidt, B., Islam, A., Segurado, A., ... & Mårtensson, A. (2018). Absence of Plasmodium falciparum K13 propeller domain polymorphisms among field isolates collected from the Brazilian Amazon Basin between 1984 and 2011. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 99(6), 1504–1507. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0554>
- Kattenberg, J., Fernandez C., Van, N., Llacsahuanga, L., Guetens, P., Valdivia, H., Van Geertruyden, J., Rovira, E., Monsieurs, P., Delgado, C., Gamboa, D. & Rosanas, A. (2023). Malaria Molecular Surveillance in the Peruvian Amazon with a Novel

- Highly Multiplexed *Plasmodium falciparum* AmpliSeq Assay. *Microbiology spectrum*, 11(2), e0096022. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00960-22>
- Kariuki, S. and Williams, T. (2020). *Human genetics and malaria resistance*. *Human Genetics*, 139, 801–811. <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02142-6>
- Le Bras, J., & Durand, R. (2003). The mechanisms of resistance to antimalarial drugs in *Plasmodium falciparum*. *Fundamental & clinical pharmacology*, 17(2), 147–153. <https://doi.org/10.1046/j.1472-8206.2003.00164>.
- Maier, A, Matuschewski, K; Zhang, M. & Rug, M. (2018). *Plasmodium falciparum*. *Trends in Parasitology*. 35(6),481-482. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.11.010>
- Mathieu, L., Cox H, Early AM, Mok S, Lazrek Y, Paquet J., ... & Musset, L. (2020). Local emergence in Amazonia of *Plasmodium falciparum* K13 C580Y mutants associated with in vitro artemisinin resistance. *Elife.*, 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.51015>
- Ministerio de salud (MINSA) (2015). NTS N° 116-2015-MINSA/DGSP-V.02 “NORMA TÉCNICA DE SALUD PARA LA ATENCION DE LA MALARIA Y MALARIA GRAVE EN EL PERU”
- Ministerio de Salud del Perú (2020). Plan hacia la eliminación de la Malaria en el Perú 2022-2030. Lima: Ministerio de Salud del Perú; 2022. <http://bvs.minsa.gob.pe/local/fi-admin/RM-034-2022%20MINSA.pdf>
- Ministerio de salud (2022) Boletín epidemiológico hasta la SE23-2022 del Perú. <https://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/sala/2022/SE23/malaria.pdf>
- Ministerio de Salud de Perú (2020). Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades. Lima: Minsa; 2020. <https://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/sala/2021/SE52/malaria.pdf>.
- Ministerio de Salud de Perú (2021). Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades [Internet]. Lima: MINSA; 2021. Disponible en: <https://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/sala/2021/SE05/malaria.pdf>.
- Mohammed, A., Yasin, K., Mahgoub, N. & Hamid, A. (2018). Cross sectional study to determine chloroquine resistance among *Plasmodium falciparum* clinical isolates from Khartoum, Sudan. *F1000Research*, 7(208). <https://doi.org/10.12688/f1000research.13273.1>
- Montenegro, C., Bustamante, T., Pajuelo, C., Bernal, M., Gonzales, L., Tapia, L., Tejedo, J. y Chenet, S. (2021) *Plasmodium falciparum* outbreak in native communities of

- Condorcanqui, Amazonas, Perú. *Malaria Journal* 20, 88. <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03608-2>
- Montenegro, L., Salas, B., Neal, A., Tobon, A., Fairhurst, R. & Lopera, M. (2021). State of artemisinin and partner drug susceptibility in *Plasmodium falciparum* clinical isolates from Colombia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 104(1):263–70. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33289466/>
- Oberstaller, J., Zoungrana, L., Bannerman, C., Jahangiri, S., Dwivedi, A., Silva, J. C., ... & Takala, S. (2021). Integration of population and functional genomics to understand mechanisms of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum*. *International Journal for Parasitology, Drugs and Drug Resistance*, 16, 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2021.05.006>
- Organización Mundial de la Salud (2021). Informe mundial de la malaria 2021. world-malaria-reports/world-malaria-report-2021-global-briefing-kit spa.pdf
- Organización Panamericana de la Salud (2020). Actualización Epidemiológica: Situación de la malaria en las Américas en el contexto de la pandemia de COVID-19, 10 de junio de 2020, Washington, D.C.: OPS/OMS. 2020
- Pathak, A., Mårtensson, A., Gawariker, S., Mandliya, J., Sharma, A., Diwan, V. & Ursing, J. (2014). Characterization of drug resistance associated genetic polymorphisms among *Plasmodium falciparum* field isolates in Ujjain, Madhya Pradesh, India. *Malaria Journal*, 13(1), 182. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-182>
- Patel, P., Bharti, P., Bansal, D., Ali, N., Raman, R., Mohapatra, P., Sehgal, R., Mahanta, J., Sultan, A., & Singh, N. (2017). Prevalence of mutations linked to antimalarial resistance in *Plasmodium falciparum* from Chhattisgarh, Central India: A malaria elimination point of view. *Scientific reports*, 7(1), 16690. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16866-5>
- Pelleau, S., Moss, E., Dhingra, S., Volney, B., Casteras, J., Gabryszewski, S., ... & Musset, L. (2015). Adaptive evolution of malaria parasites in French Guiana: Reversal of chloroquine resistance by acquisition of a mutation in *Pfcr*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(37), 11672–11677. <https://doi.org/10.1073/pnas.1507142112>
- Petersen, I., Gabryszewski, S., Johnston, G., Dhingra, S., Ecker, A., Lewis, R., ... & Fidock, D. (2015). Balancing drug resistance and growth rates via compensatory mutations in the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter: *Pfcr* impacts

- antimalarial resistance and growth rates. *Molecular Microbiology*, 97(2), 381–395. <https://doi.org/10.1111/mmi.13035>
- Recht, J., Siqueira, A., Monteiro, W., Herrera, S., Herrera, S., & Lacerda, M. (2017). Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: current challenges in malaria control and elimination. *Malaria Journal*, 16(1), 273. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1925-6>
- Restrepo, E., Arango, E., Maestre, A., Do Rosário, V., & Cravo, P. (2008). Studies on antimalarial drug susceptibility in Colombia, in relation to *Pfmdr1* and *Pfcr1*. *Parasitology*, 135(5), 547–553. <https://doi.org/10.1017/S0031182008004307>
- Reyburn, H. (2010). New WHO guidelines for the treatment of malaria. *BMJ*, 340 (1), c2637–c2637. <https://doi.org/10.1136/bmj.c2637>
- Rondón, M., & Tobón, A. (2018). Actividades de vigilancia epidemiológica de la malaria en la red diagnóstica de la frontera colombiana-peruana. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 35, 373-381. <http://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2018.353.3575>
- Ruebush, T., Neyra, D., & Cabezas, C. (2004). Modifying national malaria treatment policies in Peru. *Journal of Public Health Policy*, 25(3,4), 328–345. <https://doi.org/10.1057/palgrave.jphp.3190032>
- Sáenz, F. E., Morton, L. C., Okoth, S. A., Valenzuela, G., Vera-Arias, C. A., Vélez-Álvarez, E., Lucchi, N. W., Castro, L. E., & Udhayakumar, V. (2015). Clonal population expansion in an outbreak of *Plasmodium falciparum* on the northwest coast of Ecuador. *Malaria Journal*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12936-015-1019-2>
- Salas, C. (2007). Marcadores moleculares asociados a *Plasmodium falciparum* resistente a sulfadoxina-pirimetamina en las localidades de Caballococha y Padre Cocha, región Loreto, Perú (Tesis de Maestría). UNMSM. Lima, Perú. <https://hdl.handle.net/20.500.12672/2483>
- Santolalla, M. (2015). Prevalencia de mutaciones en los genes *PFDHFR* y *PFDHPS* de *Plasmodium falciparum* en muestras de pacientes con malaria severa y/o complicada, del banco de muestras biológicas del NAMRU-6. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú. <https://hdl.handle.net/20.500.12672/4620>
- Sato, S. (2021). *Plasmodium* a brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology. *Journal of Physiological Anthropology*, 40 (1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s40101-021-00254-0>

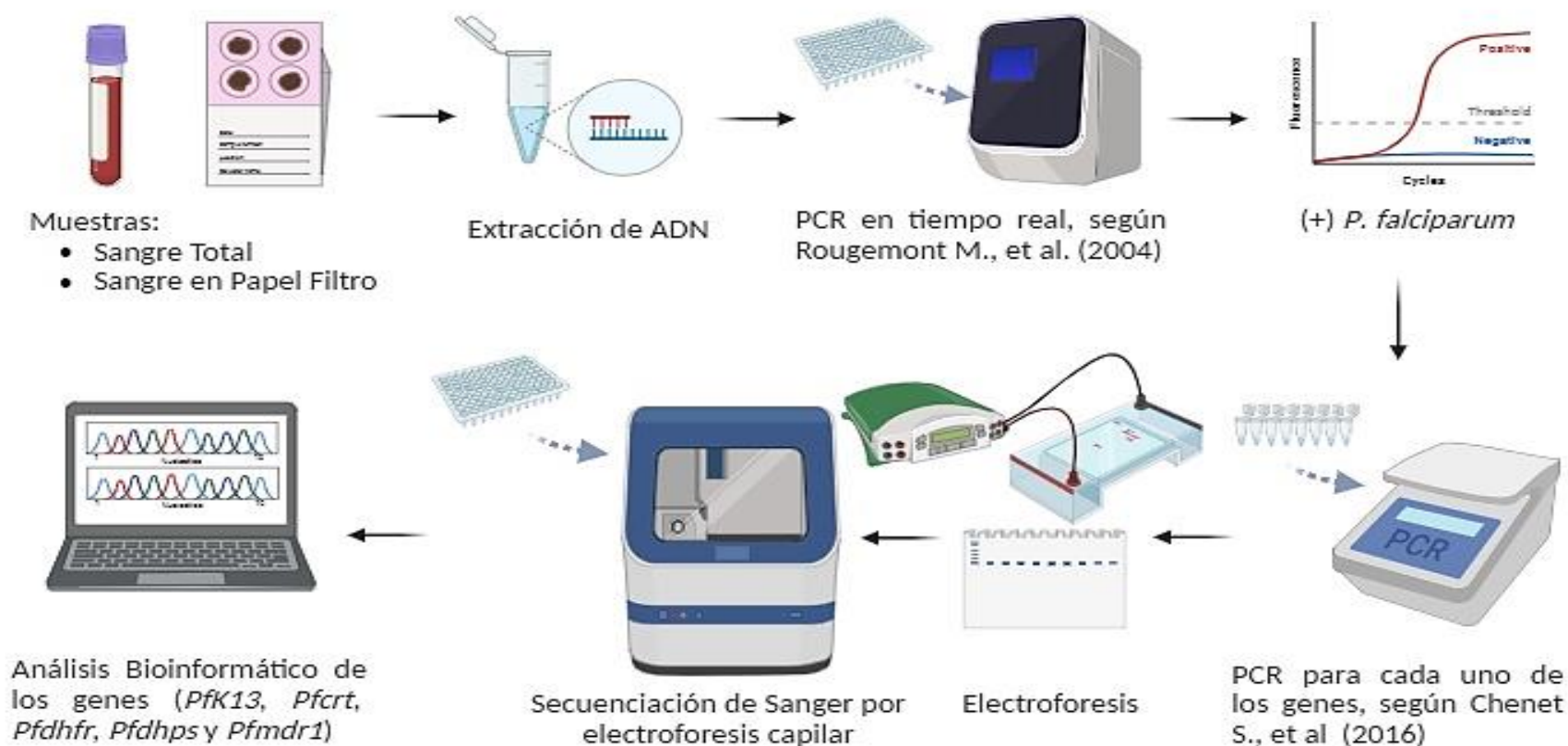
- Shah, M., Omosun, Y., Lal, A., Odero, C., Gatei, W., Otieno, K., Gimnig, J., Kuile, F., Hawley, N., Bernard, K., Simón, W., Edward, S. Laurence, H. & Mary, S. (2015). Assessment of molecular markers for anti-malarial drug resistance after the introduction and scale-up of malaria control interventions in western Kenya. *Malaria Journal*, 14(1), 75. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0588-4>
- Shibeshi, M., Kifle, Z. & Atnafie, S. (2020). Antimalarial Drug Resistance and Novel Targets for Antimalarial Drug Discovery. *Infection and drug resistance*, 13, 4047–4060. <https://doi.org/10.2147/IDR.S279433>
- Schmedes, E., Patel, D., Dhal, S., Kelley, J., Svingel, S., Dimbu, P., & Talundzic, E. (2021). *Plasmodium falciparum* kelch 13 Mutations, Countries in Africa, 2014–2018. *Emerging Infectious Diseases*, 27(7), 1902-1908. <https://doi.org/10.3201/eid2707.203230>
- Stokes, B., Dhingra, S., Rubiano, K., Mok, S., Straimer, J., Gnädig, N., ... & Fidock, D. (2021). *Plasmodium falciparum* K13 mutations in Africa and Asia impact artemisinin resistance and parasite fitness. *ELife*, 10, e66277. <https://doi.org/10.7554/eLife.66277>
- Su, X., Lane, K., Xia, L., Sá, J., & Wellems, T. (2019). *Plasmodium* genomics and genetics: New insights into malaria pathogenesis, drug resistance, epidemiology, and evolution. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(4). <https://doi.org/10.1128/cmr.00019-19>
- Supo, J., & Zacarías, H. (2020). *Metodología de la investigación científica*. Lima, Peru: Sociedad Hispana de Investigaciones Científicas.
- Talundzic E., Chenet S., Goldman I., Patel D., Nelson J. & Plucinski M, (2015) Genetic Analysis and Species Specific Amplification of the Artemisinin Resistance-Associated Kelch Propeller Domain in *P. falciparum* and *P. vivax*. PLoS ONE 10(8): e0136099. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136099>
- Tuedom, A., Sarah, E., Moukoko, C., Feufack, B., Maffo, C., Bayibeki, A., ... & Nsango, S. (2021). Antimalarial drug resistance in the Central and Adamawa regions of Cameroon: Prevalence of mutations in *P. falciparum* *Pfcr*, *Pfmdr1*, *Pfdhfr* and *Pfdhps* genes. *PloS One*, 16(8), e0256343. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256343>
- Varo, R., Chaccour, C. & Bassat, Q. (2020) Update on malaria. *Med Clin*. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2020.05.010>.

- Van Bergen, K., Stuitje, T., Akkers, R., Vermeer, E., Castel, R., & Mank, T. (2021). Evaluation of a novel real-time PCR assay for the detection, identification and quantification of *Plasmodium* species causing malaria in humans. *Malaria Journal*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03842-8>
- Valdivia, H., Villena, F., Lizewski, S., Garcia, J., Alger, J. & Bishop, D. (2020). Genomic surveillance of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* cases at the University Hospital in Tegucigalpa. *Honduras Sci Rep.* 10:20975. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78103-w>
- Valenzuela, G., Castro, L., Valencia, J., Vera, C., Rohrbach, P., Sáenz, E. (2019). Genotypes and phenotypes of resistance in Ecuadorian *Plasmodium falciparum*. *Malar Journal*. 18(1):415. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-3044-z>
- Veiga, I., Dhingra, K., Henrich, P., Straimer, J., Gnädig, N., Uhlemann, C., Martin, R. E., Lehane, A. M., & Fidock, D. A. (2016). Globally prevalent PfMDR1 mutations modulate *Plasmodium falciparum* susceptibility to artemisinin-based combination therapies. *Nature Communications*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms11553>
- Villena, F., Sánchez, J., Nolasco, O., Braga, G., Ricopa, L., Barazorda, K., ... & Valdivia, H. (2022). Drug resistance and population structure of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in the Peruvian Amazon. *Scientific Reports*, 12(1), 16474. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21028-3>
- Warsame, M., Hassan, A. M., Barrette, A., Jibril, A. M., Elmi, H. H., Arale, A. M., Mohammady, H. E., Nada, R. A., Amran, J. G. H., Muse, A., Yusuf, F. E., & Omar, A. S. (2015). Treatment of uncomplicated malaria with artesunate plus sulfadoxine-pyrimethamine is failing in Somalia: evidence from therapeutic efficacy studies and *Pfdhfr* and *Pfdhps* mutant alleles. *Tropical Medicine & International Health: TM & IH*, 20(4), 510–517. <https://doi.org/10.1111/tmi.12458>
- World Health Organization. (2020). Resistencia a los antimicrobianos <https://apps.who.int/iris/handle/10665/255204>.
- Yasri, S., & Wiwanitkit, V. (2021). Artemisinin resistance: an important emerging clinical problem in tropical medicine. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*, 13(6), 152–157. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35103097/>
- Zheng, Z. & Cheng, Z. (2017). Advances in Molecular Diagnosis of Malaria. *Advances in Clinical Chemistry* 80(65-2423). <http://dx.doi.org/10.1016/bs.acc.2016.11.006>

ANEXOS




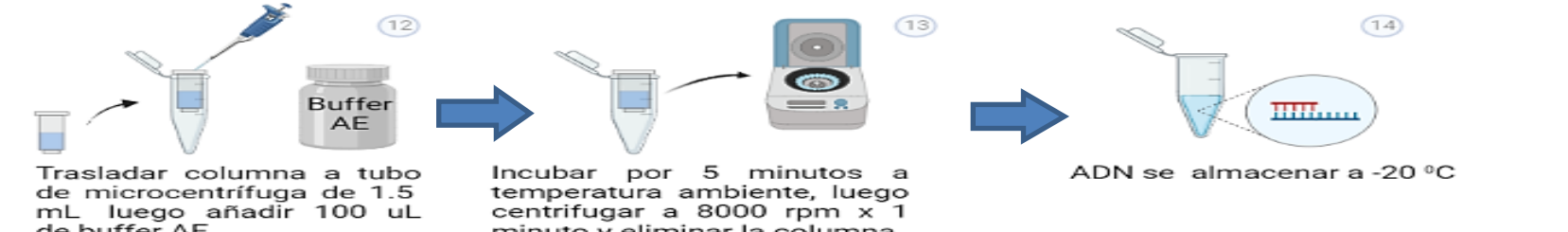
ANEXO 1

Fase experimental de la caracterización molecular de P. falciparum en muestras las comunidades del distrito Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022



ANEXO 2

Lisis, unión del ADN, lavado y elusión de ADN en muestras de sangre en papel y sangre total, mediante el kit comercial Invitrogen

Lisis	 <p>Muestras: sangre en papel y sangre total</p> <p>Kit de extracción Qiagen</p> <p>200 µL de la muestra, 20 µL proteínasa K, 200 µL de buffer AL y vortexear</p> <p>Termobloqueo: incubar a 56 °C por 15 minutos.</p>
n del ADN	 <p>Agregamos 200 µL de etanol y vortexear</p> <p>Traspasar todo el contenido del tubo a columna y centrifugar a 8000 rpm x 1 minuto</p> <p>Trasladar la columna al siguiente tubo recolector</p>
Lava do	 <p>Añadir 500 uL de AW1 y centrifugar a 8000 rpm x 1 min.</p> <p>Trasladar columna al siguiente tubo recolector y eliminar sobrenadante.</p> <p>Añadir 500 uL de AW2 y centrifugar a 14000 rpm x 3min.</p> <p>Trasladar la columna al siguiente tubo recolector y centrifugar a 14000 rpm x 1 minuto.</p>
Elus ión	 <p>Trasladar columna a tubo de microcentrífuga de 1.5 mL luego añadir 100 uL de buffer AE.</p> <p>Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente, luego centrifugar a 8000 rpm x 1 minuto y eliminar la columna.</p> <p>ADN se almacenar a -20 °C</p>

ANEXO 3

Reactivos para la extracción de ADN, según el protocolo del kit comercial QIAamp ADN mini kit empleados en las muestras de las comunidades del distrito Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022

Reactivos QIAamp ADN Mini Kit	Cantidad
Buffer AL	200 uL
Etanol al 99%	200 uL
Proteinasa K	20 uL
Solución de lavado AW1	500 uL
Solución de lavado AW2	500 uL
Buffer elución AE	100uL

ANEXO 4

Lista de sondas y partidores, utilizados para la determinación de especie de Plasmodium falciparum y Plasmodium vivax en las comunidades del distrito Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022

q-PCR	Partidor/ Sondas	Secuencia nucleotídica	Marcación de sonda 5'→3'	Tamaño (pb)	Tm (°C)
Especie	Plasmo 1	GTTAAGGGAGTGAAGACG ATCAGA	No aplica	160	60
P. falciparum	Plasmo 2	AACCCAAAGACTTTGATTT CTCATAA	No aplica	160	60
	Falcprobe	AGCAATCTAA AAGTCACCTCGAAAGATG ACT	FAM - TAMRA	160	60
P. vivax	Vivprobe	AGCAATCTAAGAATAAACT CCGAAGAGAAAATTCT	VIC - TAMRA	160	60

ANEXO 5

Condiciones de master mix PCR anidado para la amplificación del gen Pfk13 en las comunidades del distrito Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022

1^{er} PCR: con cebadores *Pfk13_F1* y *Pfk13_R1*

Reactivo	Concentración Inicial	Volumen (μL)	Concentración final	Volumen (μL) 1 RX
PCR Buffer	10x	3 uL	1x	3 uL
MgCl ₂	50 mM	1.2 uL	2 mM	1.2 uL
DNTPs	25 mM	0.24 uL	0.2 mM	0.24 uL
<i>Pfk13_F1</i>	10 μM	1.5 uL	0.5 μM	1.5 uL
<i>Pfk13_R1</i>	10 μM	1.5 uL	0.5 μM	1.5 uL
Agua BM	-	18.36 uL	-	18.36 uL
Taq Polimerasa	5 U/μL	0.2 uL	1 U/ uL	0.2 uL
Templado	4 μL	4 uL	-	4 uL
Volumen final				30 uL

2^{do} PCR-anidado con los cebadores *Pfk13_F2* y *Pfk13_R2*

Reactivo	Concentración Inicial	Volumen (μL)	Concentración final	Volumen (μL) 1 RX
PCR Buffer	10 x	3 uL	1x	3 uL
MgCl ₂	50 mM	1.2 uL	2 mM	1.2 uL
DNTPs	25 mM	0.24 uL	0.2 mM	0.24 uL
<i>Pfk13_F2</i>	10 uM	1.5 uL	0.5 μM	1.5 uL
<i>Pfk13_R2</i>	10 uM	1.5 uL	0.5 μM	1.5 uL
Agua BM	-	18.36 uL	-	18.36 uL
Taq Polimerasa	5 U/uL	0.2 uL	1 U/ uL	0.2 uL
Templado	4 uL	4 uL	-	4 uL
Volumen final				30 uL

ANEXO 6

Condiciones de mater mix de PCR convencional y estándar utilizado para la amplificación del gen Pfcrt en las comunidades del distrito Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022

Reactivo	Concentración	Volumen (μL)	Concentración	Vol. Final (μL) 1 RX
	Inicial		final	
PCR Buffer	10x	6 uL	2x	6 uL
MgCl ₂	50 mM	0.8 uL	2mM	0.8 uL
DNTPs	25 mM	0.16 uL	0.4 mM	0.16 uL
<i>Pfcrt_F1</i>	10 uM	1 uL	0.5 μM	1 uL
<i>Pfcrt_R1</i>	10 uM	1 uL	0.5 μM	1 uL
Agua BM	-	16.29 uL	-	16.29uL
Taq Polimerasa	5 U/uL	0.2 uL	1 U/μL	0.2 uL
Templado	4 uL	4 uL	-	4 uL
Volumen final				30 uL

ANEXO 7

Condiciones de mater mix de PCR convencional y estándar utilizado para la amplificación del gen Pfdhps en las comunidades del distrito Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022

Reactivo	Concentración	Volumen (μL)	Concentración	Vol. Final (μL) 1RX
	Inicial		final	
PCR Buffer	10x	3 uL	1x	3 uL
MgCl ₂	50 mM	1.2 uL	2 mM	1.2 uL
DNTPs	25 mM	0.24 uL	0.2 mM	0.24 uL
<i>Pfdhps_F1</i>	10 uM	1.5 uL	0.5 uM	1.5 uL
<i>Pfdhps_R1</i>	10 uM	1.5 uL	0.5 uM	1.5 uL
Agua BM	-	18.36 uL	-	21.76 uL
Taq Polimerasa	5 U/uL	0.2 uL	1 U/uL	0.8 uL
Templado	4 uL	4 uL	-	4 uL
Volumen final				30 uL

ANEXO 8

Condiciones de mater mix de PCR convencional y estándar utilizado para la amplificación del gen Pfdhfr en las comunidades del distrito Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022

Reactivo	Concentración Inicial	Volumen (μL)	Concentración final	Vol.Final (μL) 1 RX
PCR Buffer	10x	3 uL	1x	3 uL
MgCl ₂	50 mM	1.2 uL	2 mM	1.2 uL
DNTPs	25 mM	0.24 uL	0.2 mM	0.24 uL
<i>Pfdhfr_F1</i>	10 uM	1.5 uL	0.5 uM	1.5 uL
<i>Pfdhfr_R1</i>	10 uM	1.5 uL	0.5 uM	1.5 uL
Agua BM	-	18.36uL	-	18.36uL
Taq Polimerasa	5 U/uL	0.2 uL	1 U/uL	0.2 uL
Templado	4 uL	4 uL	-	4 uL
Volumen final				30 uL

ANEXO 9

Condiciones y estandarización de master mix PCR convencional utilizado para la amplificación del gen Pfmndr1 en las comunidades del distrito Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022.

Reactivo	Concentración Inicial	Volumen (μL)	Concentración final	Vol.Final (μL) 1 RX
PCR Buffer	10x	3 uL	1x	3 uL
MgCl ₂	50 mM	1.5 uL	2.5 mM	1.2 uL
DNTPs	25 mM	0.48 uL	0.4 mM	0.24 uL
<i>Pfmndr1_F1</i>	10 uM	1.5 uL	0.5 uM	1.5 uL
<i>Pfmndr1_R1</i>	10 uM	1.5 uL	0.5 uM	1.5 uL
Agua BM	-	17.82uL	-	18.36uL
Taq Polimerasa	5 U/uL	0.2 uL	1 U/uL	0.2 uL
Templado	4 uL	4 uL	-	4 uL
Volumen final				30 uL

ANEXO 10

Reactivos empleados para elaboración del gel de electroforesis al 2%

Medio y Reactivo	Concentración final	Volumen final	Cantidades
Gel de Agarosa	2 %	75 mL	Agarosa 1.5 g
			Buffer TAE 1X 75 mL
Buffer TAE 1X	1X	1000 mL	Buffer TAE 50X (TAE 20 mL y agua destilada 980 mL)

ANEXO 11. Solicitud de aprobación para la ejecución del proyecto de investigación. Laboratorio del Instituto de Enfermedades Tropicales de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (IET-UNTRM)



UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRÍGUEZ DE
MENDOZA DE AMAZONAS



INSTITUTO
DE ENFERMEDADES
TROPICALES
IET - UNTRM

“Año del fortalecimiento de la soberanía nacional”

SOLICITUD: Autorización para ejecución de proyecto de tesis en el laboratorio del Instituto de enfermedades tropicales-UNTRM.

Dr.

ALONSO RAFAEL TAPIA LIMONCHI

Director del Instituto de Enfermedades Tropicales.

UNIVERSIDAD TORIBIO RODRIGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS.

Presente.-

El que suscribe **Sandoval Bances Julio César**, identificado con DNI N° **75654541**, Bachiller en Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas - Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Tengo a bien dirigirme a usted, con la finalidad de comunicarle que solicito autorización para la ejecución del proyecto de tesis titulado: “**Caracterización molecular de *Plasmodium falciparum* asociada a resistencia a antimaláricos en comunidades del distrito Río Santiago, Condorcanqui, Amazonas 2022**”, en las instalaciones del Instituto de Enfermedades Tropicales del cual usted es el director.

Con saludos cordiales y a tiempo de agradecerle su atención a esta solicitud, aprovecho la oportunidad para reiterarle mi más alta consideración y estima.

Atentamente,


Sandoval Bances Julio César
DNI N° 75654541

Autorización,



Dr. ALONSO RAFAEL TAPIA LIMONCHI
INVESTIGADOR PRINCIPAL
Tapia Limonchi Alonso Rafael
DNI N° 25770545

Chachapoyas, 02 de junio del 2022

Calle Higos Urco N° 350 / Campus Universitario
Chachapoyas - Perú

ANEXO 12

Procedimiento estándar utilizado para la purificación de productos de PCR y de productos de secuenciamiento

A. Aislamiento y purificación del Amplicon

Kit que contiene formulaciones optimizadas de exonucleasa I termolábil y fosfatasa alcalina para eliminar o degradar los cebadores de PCR residuales y desfosforilar el exceso de dNTPs, después de la amplificación, el producto de PCR para el siguiente paso.

Del producto obtenido de la PCR (10 μ L), se añadió 5 μ L del reactivo **Exocip A** (NEB, M1051AA) más 5 μ L **Exocip B** (NEB, M1052AA), luego se realizó un vortex y un spin. Finalmente se llevó al termociclador por una duración de 7 minutos.

Ciclaje:

- a) 37 °C x 4 min = 1x
- b) 80 °C x 1 min = 1x
- c) 4 °C x ∞ = 1x

B. Reacción de Big Dye

Una vez purificado el producto obtenido de la PCR, se realizó la reacción de secuenciación en las bases nucleotídicas de las secuencias amplificadas que quedarán marcadas con fluorescencia mediante un kit comercial Big Dye (Applied biosystems, ref.: 4336917). Se siguió el procedimiento estandarizado por parte del Instituto de enfermedades tropicales-UNTRM:

- a) Se añadió 1 μ L Big dye
- b) Se añadió 2 μ L Sequencing buffer
- c) Se utilizó 0.5 μ L Primers Forward ó Reverse
- d) Agregue 5.5 μ L agua de PCR
- e) Por último, se añadió 1 μ L PCR (producto purificado, EXOCIP)

❖ Luego se realizó un vortex y se llevó inmediatamente al termociclador con un ciclaje:

- a) 96°C x 1 min = 1x
 - b) 96°C x 10 seg
 - c) 50°C x 5 seg
 - d) 60°C x 4 min
 - e) 4 °C x ∞ = 1x
- } 25 x

- ❖ Para finalizar se retiró la placa del termociclador e inmediatamente se realizó un spin y luego se cubrió con papel aluminio.

ANEXO 13

Secuencias obtenidas de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI)

Gen *Pfk13*

>NC_004331.3:c1726997-1724817 Conjunto del genoma 3D7 de *Plasmodium falciparum*, Cromosoma: 13

ATGGAAGGAGAAAAAGTAAAAACAAAAGCAAATAGTATTCTCGAATTTTTCT
ATGACGTATGATAGGGAATCTGGTGGTAACAGCAATAGTGATGATAAAAGCG
GAAGTAGTAGCGAGAATGATTCTAATTCATTTATGAATCTAACTAGTGATAAA
AATGAGAAAACGGAAAATAATAGTTTCCTTTTAAATAATAGTAGTTATGGAAA
TGTTAAAGATAGCCTATTAGAATCCATTGATATGAGGTGTATTAGATTCTGAAC
TTTGATAGTAAAAAAGATTTTTTACCAAGTAATTTATCAAGAACATTTAATAAT
ATGTCTAAAGATAATATAGGAAATAAATATTTAAATAAATTGTAAATAAAAA
AAAAGATACTATTACAAATGAAAATAATAATATTAATCATAATAATAAAT
AATAATCTGACAGCAAATAATACTAATAATCTTATTAATAATAATATGAA
TTCTCCATCAATTATGAATACCAACAAAAAAGAGAATTTTTTAGATGCAGCA
AATCTTATAAATGATGATTCTGGATTAAACAATTTAAAAAAATTTTCAACTGTA
AATAATGTAAATGATACTTATGAAAAGAAAATTATTGAAACGGAATTAAGT
GATGCTAGTGATTTTGAAAATATGGGTAGGTGATTTAAGAATTACATTTATTA
ATTGGTTAAAAAGACACAAATGAATTTTATTCGAGAAAAAGATAAATTATTTA
AAGATAAGAAAGAACTAGAAATGGAAAGAGTACGATTTGTACAAAGAATTAG
AAAACCGTAAAAATATTGAAGAACAGAAATTACATGAATGAAAAGAAAGAAA
TTAGATATTGATATATCTAATGGTTATAACAAATAAAAAAAGAAAAAGAAA
GAACATAGGAAACGATTTGATGAAGAAAGATTAAGATTTTACAAGAAATCG
ATAAAATTAAATTAGTATTATTTAGAAAAAGAAAAAATATTATCAAGATAT
AAAAATTTTGAGAATGATAAAAAAATTGTTGATGCAAATATTGCTACTGA
AACTATGATTGATATTAATGTTGGTGGAGCTATTTTGAACATCTAGACATAA
CCTTAACACAACAAAAGATTCATTTATAGAGAAATTATTAAGTGGAAGACAT
CATGTAACCAGAGATAAACAAGGAAGAATATTCTTAGATAGGGATAGTGAGT
TATTTAGAATTATACTTAACCTCTTAAGAAAATCCGTTAACTATAACCCATACC
AAAAGATTTAAGTGAAAGTGAAGCCTTGTTGAAAGAAGCAGAATTTTATGGTA
TTAAATTTTTACCATTCCCATTAGTATTTTGTATAGGTGGATTTGATGGTGTAG
AATATTTAAATTCGATGAATTATTAGATATTAGTCAACAATGCTGGCGTATGTG
TACACCTATGTCTACCAAAAAAGCTTATTTTGGAAAGTGCTGTATTGAATAAT
TTCTTATACGTTTTTGGTGGTAATAACTATGATTATAAGGCTTTATTTGAACT
GAGGTGTATGATCGTTTAAGAGATGTATGGGTATGTTTCAAGTAATTTAATA

TACCTAGAAGAAATAATTGTGGTGTACGTCAAATGGTAGAATTTATTGTATT
 GGGGGATATGAGGCTCTTCTATTATACCGAATGTGAAGCATATGATCATCGTA
 TGAAAAGCATGGGTAGAGGTGGCACCTTTTGAATACCCCTAGATCATCAGCTA
 TGTGTGTTGCTTTTGATAATAAAATTTATGTCATTGGTGGAACATAATGGTGAGA
 GATTAAATTCTATTGAAGTATATGAAAGAAAAAATGAATAAATGGGAACAATT
 TCCATATGCCTTATTAGAAGCTAGAAGTTCAGGAGCAGCCTTTTAATTACCTTA
 ATCAAATATATGTTGTTGGAGGTATTGATAATGAACATAACATATTAGATTCC
 GTTGAACAATATCAACCATTTAATAAAAAGATGGCAATTTCTAAATGGTGTACC
 AGAGAAAAAAATGAATTTTGGAGCTGCCACATTGTCAGATTCTTATATAATTA
 CAGGAGGAGAAAAATGGCGAAGTTCTAAATTCATGTCATTTCTTTTCACCAGAT
 ACAATGAATGGCAGCTTGGCCCATCTTTATTAGTTCCCAGATTTGGTCACTCC
 GTTTTAATAGCAAATATATAA

Gen *Pfert*

>NC_004328.3:403222-406317 Conjunto del genoma 3D7 de *Plasmodium falciparum*,

Cromosoma: 7

ATGAAATTCGCAAGTAAAAAAATAATCAAAAAAATTCAAGCAAAAATGACG
 AGCGTTATAGAGAATTAGATAATTTAGTACAAGAAGGAAGTAAGTATCCAAA
 AATGGAAATATGGAATGATATAAATGAATAGATAAATCAACCTATTGGATATA
 TATATATATATATATATATATATATATATATATATATGTATAACCCATATGTATTA
 ATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCCTTGTCGACCTTAAACAG
 ATGGCTCACGTTTAGGTGGAGGTCTTGTCTTGGTAAATGTGCTCATGTGTTTA
 AACTTATTTTAAAGAGATTAAGGATAATTTTTTATTATATTTAAGTATTA
 TTTATTTAAGTGTATGTGTAATGAATAAAATTTTGTCTAAAAGAACTTTAACAA
 AATTGGTAACCTATAGTTTTTAACATCCGAACTCACAACCTTTATTTGTATGATT
 ATGTTCTTTATTGTTTATTCCTTATTTGGAAATAAAAAGGGAAATTCAAAAGTA
 AGATAAATCAATATATTTAAATGATGGATTTATAAGAGAATCTATTCCACCTA
 CCAATATAAAACATTACACATATATATATATATATATATATATATATATATATA
 TATATATATATGTATGTATGTTGATTAATTTGTTTATATATTTATATTTATTTCT
 TATGACCTTTTTAGGAACGACACCGAAGCTTTAATTTACAATTTTTTGTCTATAT
 CCCATGTTAGATGCCTGTTTCAGTCATTTTGGCCTTCATAGGTCTTACAAGAACT
 ACTGGAAATATCCAATCATTTGTTCTTCAATTAAGTATTCCTATTAATATGTTT
 TTCTGCTTTTTTAATTATTAAGATATAGGTAAGTATACTATTTTAAATTACAAA
 AAATATAAAATATATAT
 ATATATTTATATATATTTATTTATATATTTATATATATTTATTTATATATTTATA
 TATTTATTTATTTATATTTATTTATTTACTCCTTTTTAGATATCACTTATACAATT
 ATCTCGGAGCAGTTATTATTGTTGTAACAATAGCTCTTGTAGAAATGAAATTAT
 CTTTTGAAACACAAGAAGAAAATTCTATCATATTTAATCTTTGTCTTAATTAGT
 GCCTTAATTGTAAGAAAACAAAATATATAAATAAATAAATATATATATATATA
 TATATATATTGTAATATTTAATATATATTAACACTTAACTTTGTTTTTTATTATA
 ATTAATTTATATTCTTTATCATTTTTTTTTTTTTTTTTTCCCTTCTTTTTTTTTAGC
 CCTGTATGCTTTTCAAACATGACAAGGGAAATAGTTTTTAAAAAATATAAGAT

TGACATTTTTTAAGATTAAATGTAAGAAGAAAAATATAATAATAATAATATATA
TATTATATATATATTTCCCTTTTTTACCACTTTTTTTTTTTTTTATTCCTATAACGCA
TTATAATTATTTCTGTTATTTTTTATTTCTTATAGGCTATGGTATCCTTTTTTCCAA
TTGTTCACTTCTTGCTTATATTACCTGTATACACCCTTCCATTTTTTAAAACAAC
GTAAGAATTAATTAGGAAAGAAAAAATAAAATAAAATGAAATGTGCCCATAT
ATATATATATATATATGTATGTATGTATAATTTTCCCTTTTTTAGTTCATTTACC
ATATAATGAAATATGGACAAATATAAAAAAATGGTTTCGCATGTTTATTCTTGG
GAAGAAACACAGTCGTAGAGGTAAAATAGGATTTTCATTATATATTA AAAAATT
ACTACTTATTATGTTAATAAAAAAATATGTTTTTTAATGTTCAATTTGTTTTATT
TTAATTATTTTTTTTTTTTTTTTTGTTTTTGTTCCTCTTCAGAATTGTGGTCTTGGTA
TGGCTAAGTTATGTGATGATTGTGACGGAGCATGGGTAAAGAAGCTTATAATAA
AATTTCAAATTATAAGAGACATTTATATATATTTTAACAATAATAATTAAATA
AAACAATATTATATATATTATATATATTATTATTTTATTTATTATTTTTTATTTTT
TTTTTTAGAAAACCTTCGGCATTGTTTTTCTTCTTAAACATTTGTGATAATTTAA
TAACCAGCTATGTAAGAATAAAAAGGATGAAAAAACGTTGATACATACAAGA
GGAAATAAATATGGGAATGTTTAATTGAATTAAGATATATATATATATATATA
TATATATATATATATATGTAACCATATAATTTTTCATTTTCTATGCTTTTTATAG
ATTATCGACAAATTTTCTACCATGACATATACTATTGTTAGTTGTATACAAGGT
CCAGCAATAGCAATTGCTTATTACTTTAAATTCTTAGCCGTAAGAATTA AAAA
GATATAAATATATAAATATATATGTGAAATATATGATATATATGATATATATTT
TTTATATGTAATGTTTTTTTTTTTTTTTTTCACAATATACATTTAAATGTTTATGATG
GTACAACGTATCATATTTTATAATAATTTTATGCATTCATGTATATTATTTTAC
TTTTTAATTTTATAGGGTGATGTTGTAAGAGAACCAAGATTATTAGATTTTCGTA
ACTTTGGTAAGTGTGGAAATTA AAAAATGAATTTTTTTTTTTTTTTTTTATGAAC
AAAATAATGTGTATATAATATGTGTGTAATATCAAATGGCTTGTTTCGTTACATAA
ATATTTATATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTACAAGTTTGGCTACCTA
TTTGGTTCTATAATTTACCGTGTAGGAAATATTATCTTAGAAAGTAATACAAAA
ATAAGATAAAAAAATATAATATATAAAATATGTATATTGTTCTTATATATTTTG
TTCATATATATATATATATATATATATATATTTTAAATTTCCATCTGTCTTTTTT
ATTCTATTGTTATAATTTATCATAAATTTTTTTTTAAATTTGCTTACATTAGGAAA
AAAAATGAGAAATGAAGAAAATGAAGATTCCGAAGGAGAATTAACCAACGTC
GATTCAATTATTACACAATAA

Gen *Pfdhps*

>XM_001349382.1 *Plasmodium falciparum* 3D7 hidroximetildihidropterina
pirofosfoquinasa-dihidropteroato sintasa (PF3D7_0810800).

ATGGAAACTATACAAGAACTAATACTTTCTGAGGAAAATAAACTAATATTGC
CGTATTAACTTAGGAACAAATGATAGAAGAAACGCTGTGTTGATTCTAGAAA
CTGCCTTGGCACCTTGTCGAAAAATTTTAGGAAAAATTATTAATACGTCCTAC
TTGTATGAAACCGTTCCAGAATACATTGTATTAGATAAAAAGGAAAGTTGCGA
AAAAATAACAAGGATTGTCGTATATATGATGTTAATTATATAAACGAATTGA

TGCAAAATTTAGAAGAATCTAAATATGAAGAGAATAAAGAATTAATTGATAA
 ATGTGAAGAATATGAAACATTTTTGAAAAATGGAAAAGTTGATAATAGTATTC
 TAAAGGAAGTAAATGTAGAAAATTATTATTAGAATGTAATAATATAATAGTAA
 AGAATGACGAAATAATGAAAAATAATTTAAGCAAATATAAAGATAAATATTA
 TACTAGCTACTTTTATAATTTGACAGTTGTAGTTAAACTTTTGTAAATGATCC
 TCTTAGTATGTTGGTAGTTATAAAATATATTGAAGAATTAATGAAAAGGGAAA
 ATGTAAAAGAGAAAGAAAAAATTTGAAAATCGTATAATAGATATAGATATTCTA
 TTTTTTAATGATTTTACAATCTTTATGAAAAACATAAAATTGGAAAAAAATATG
 ATTTATAAAATACTCTCAAAATATATTCATTTGGAAAGAGATATAAAAAATGG
 AAATGACAATATGTCTAAAGTAAATATGGATAAAGATATAAATCTTAATAATA
 ACAATAATATAAAAAAAAAAAAAATAATAATGATATTGATTGTGATTGGTGGATC
 AGAAGATGAATAATCATGTGAATAATAAAAATTATATAAATTCTTTTAGAGAT
 CCACAAGAAATAATAAACAATATGGTAGATAATATTGAATTTTTATCCATTCC
 TCATGTGTATACAACACACAGATATAGCATACTTTTATGCTTAAATGATATGAT
 ACCCGAATATAAGCATAATGTTTTAAATAATACCATCAGATGTTTATATAACA
 AATATGTGAGTAGGATGAAAGAACAATATAATATAAATATTAAGAAAAATAA
 TAAAAGGATATATGTATTAAAAGATAGAATTTCTTATTTAAAAGAAAAAACAA
 ATATTGTTGGAATATTAAATGTTAATTATGATTCTTTTTCAGATGGAGGTATTT
 TTGTTGAACCTAAACGTGCTGTTCAAAGAATGTTTGAAATGATAAATGAAGGT
 GCTAGTGTTATAGATATAGGTGGAGAATCCTCTGGTCCCTTTTGTATACCTAA
 TCCAAAAATTAGTGAAAGAGATTTAGTAGTACCTGTATACAATTATTTCAAAA
 AGAATGGAATGATATAAAAAATAAAATTGTTAAATGTGATGCGAAACCAATT
 ATAAGTATTGATACAATTAACATAATGTTTTTAAAGAATGTGTTGATAATGAT
 TTAGTTGATATATTAAATGATATTAGTGCTTGTACAAATAATCCAGAAATTATA
 AAATTATTAAAAAAAAAAAAACAAATTCTATAGTGTTAGTTCTAATGCATAAAA
 GAGGAAAATCCACATACAATGGATAAACTAACAAATTATGATAATCTAGTTTA
 TGATATAAAAAATTATTTAGAACAAAGATTAAATTTTCTTGTATTAAATGGAA
 TACCTCGTTATAGGATACTATTTGATATTGGATTAGGATTTGCGAAGAAACAT
 GATCAATCTATTAACTCTTACAAAATATACATGTATATGATGAGTATCCACTT
 TTTATTGGATATTCAAGAAAAAGATTTATTGCCCATTTGCATGAATGATCAAAA
 ATGTTGTAATAAATACACAACAAAAATTACATGATGAACAACAAAATGAAAA
 TAAAAATATTGTGGACAAATCACACAATTGGATGTTTCAAGATGAATTACA
 TGAGGAAAGACAAGGATCAACTTTTATATCAAAAAAATATATGTGGTGGATTA
 GCAATTGCTTCCTACAGCTATTATAAAAAGGTAGATCTAATAAGAGTTCATGA
 CGTTTTAGAAACAAAATCGTTTTGGATGTTTTAACAAAAATAGACCAAGTGTA
 A

Gen *Pfdhfr*

>XM_001351443.1 *Plasmodium falciparum* 3D7 dihidrofolato reductasa-timidilato sintasa
 bifuncional (PF3D7_0417200).

ATGATGGAACAAGTCTGCGACGTTTTTCGATATTTATGCCATATGTGCATGTTGT
 AAGGTTGAAAGCAAAAATGAGGGGGAAAAAAATGAGGTTTTTAATAACTAC
 ACATTTAGAGGTCTAGGAAATAAAGGAGTATTACCATGGAAATGTAATCCCT
 AGATATGAAATATTTTTGTGCAGTTACAACATATGTGAATGAATCAAAATATG
 AAAAATTGAAATATAAGAGATGTAAATATTTAAACAAAGAACTGTGGATAA
 TGTAATGATATGCCTAATTCTAAAAAATTACAAAATGTTGTAGTTATGGGAA
 GAACAAGCTGGGAAAGCATTCCAAAAAAATTTAAACCTTTAAGCAATAGGAT
 AAATGTTATATTGTCTAGAACCTTAAAAAAGAAGATTTTGATGAAGATGTTTA
 TATCATTAACAAAGTTGAAGATCTAATAGTTTTACTTGGGAAATTAAATTACTA
 TAAATGTTTTATTATAGGAGGGTTCCGTTGTTTATCAAGAATTTTTAGAAAAGA
 AATTAATAAAAAAATATATTTTACTAGAATAAATAGTACATATGAATGTGAT
 GTATTTTTTCCAGAAATAAATGAAAATGAGTATCAAATTATTTCTGTTAGCGAT
 GTATATACTAGTAACAATACAACATTGGATTTTATCATTATAAAGAAAACGAA
 TAATAAAATGTTAAATGAACAAAATTGTATAAAAGGAGAAGAAAAAATAAT
 GATATGCCTTTAAAGAATGATGACAAAGATACATGTCATATGAAAAATTAACA
 GAATTTTACAAAAATGTAGACAAATATAAAATTAATTATGAAAATGATGATGA
 TGATGAAGAAGAAGATGATTTTGTTTATTTTTTAATTTTAATAAAGAAAAAGAA
 GAGAAAAATAAAAAATTCTATACATCCAAATGATTTTCAAATATATAATAGCTT
 GAAATATAAATATCATCCTGAATACCAATATTTAAATATTATTTATGATATTAT
 GATGAATGGAAATAAACAAAGTGATCGAACGGGAGTAGGTGTTTTAAGTAAA
 TTCGGATATATTATGAAATTTGATTTAAGTCAATATTTCCCATTATTAACACG
 AAGAAATTATTTTTAAGAGGAATTATTGAAGAATTGCTTTGGTTTATTAGAGG
 AGAAACAAATGGTAATACGTTGTAAATAAGAATGTAAGGATATGGGAAGCT
 AATGGTAACTAGGGAATTTTTAGATAATAGAAAATTATTTCATAGAGAAGTTA
 ACGATTTAGGACCTATTTATGGTTTTCAATGGAGACATTTCCGGTGCTGAATATA
 CAAATATGTATGATAATTATGAAAATAAAGGAGTGGATCAATTAATAAATATA
 ATAAATTTAATTAAAAATGATCCTACAAGTAGAAGAATTCTTTTGTGTGCATG
 GAATGTAAAAGATCTTGACCAAATGGCATTACCTCCTTGTCATATTTTATGTCA
 GGTTTTATGTTTTTCGATGGGAAATTATCATGTATTATGTATCAAAGATCATGTG
 ATTTAGGGCTAGGAGTACCTTTTTAATATTGCTTCTTATTCTATTTTTACTCATA
 TGATTGCACAAGTCTGTAAATTTGCAACCTGCGCAGTTCATACACGTTTTAGGAA
 ATGCACATGTTTATAATAATCACATTGATAGTTTAAAAATTCAACTTAACAGA
 ATACCCTATCCATTCCCAACACTTAAATTAATCCAGATATTAAAAATATTGA
 AGATTTTACAATTTTCGGATTTTACAATACAAAATTATGTTTCATGAAAAAATTC
 AATGGATATGGCTGCTTAA

Gen *Pfmdr1*

>XM_001351751.1 Proteína 1 de resistencia a múltiples fármacos 3D7 de *Plasmodium falciparum* (PF3D7_0523000).

ATGGGTAAAGAGCAGAAAGAGAAAAAAGATGGTAACCTCAGTATCAAAGAAG
 AGGTTGAAAAAGAGTTGAACAAAAAGAGTACCGCTGAATTATTTAGAAAAAT

AAAGAATGAGAAAATATCATTTTTTTTACCGTTTAAATGTTTACCTGCACAACA
TAGAAAATTATTATTTATATCATTTTGTATGTGCTGTATTATCAGGAGGAACATT
ACCTTTTTTTTATATCTGTGTTTGGTGTAAATATTAAGAACATGAATTTAGGTGA
TGATATTAATCCTATAATATTATCATTAGTATCTATAGGTTTAGTACAATTTAT
ATTATCAATGATATCAAGTTATTGTATGGATGTAATTACATCAAAAATATTAA
AAACTTTAAAGCTTTGAATATTTAAGAAGTGTTTTTTATCAAGATGGACAATTT
CATGATAATAATCCTGGATCTAAATTAAGATCTGATTTAGATTTTTTATTTAGAA
CAAGTGAGTTCAGGAATTGGTACGAAATTTATAACAATTTTTACATATGCCAG
TTCCTTTTTAGGTTTATATATTTGGTCATTAATAAAAAATGCACGTTTGACTTTA
TGTATTACTTGCGTTTTTTCCGTTAATTTATGTTTGTGGTGTGCATATGTAATAAG
AAAGTAAAATTAATAAAAAAACATCTTTGTTATATAATAACAATACCATGTC
CATTATAGAAGAGGCTTTAATGGGAATAAGAACTGTTGCAAGTTATTGTGGAG
AAAAGACTATATTAAACAAATTTAATTTGTCCGAACTTTTTATAGTAAATATA
TTTTAAAAGCTAATTTTGTAGAAGCATTACATATAGGTTTAATAAATGGTTTAA
TTTTAGTTTCTTATGCATTCGGTTTTTGGTATGGTACAAGAATTATTATAAATA
GTGCAACGAATCAATACCCCAATAATGATTTTAATGGTGCCTCAGTTATATCC
ATTTTATTAGGTGTACTTATTAGTATGTTTATGTTAACAATTATCTTACCAAAT
ATAACAGATATATGAAAGCTTTAGAAGCAACAAATAGTTTATATGAAATAATA
AATCGAAAACCATTAGTTGAAAATAATGATGATGGAGAAACATTACCAAATAT
TAAAAAAATTGAATTTAAAAATGTAAGATTTTATTATGATACTAGAAAAGATG
TTGAAATTTATAAAGATTTAAGTTTTACTCTAAAAGAAGGGAAAAACATATGC
ATTTGTGGGGAATCAGGTTGTGGGAAATCAACCATACTAAAATTAATTGAAAG
ACTTTATGATCCAACCGAAGGAGATATTATTGTAAATGATTCTCATAATTTAAA
AGATAATTAATTTGAAATGGTGGAGATCAAAAATTGGAGTTGTTAGTCAAGAT
CCATTATTATTAGTAATTCAATTAATAATAATTAATATAGTTTATATAGT
TTAAAAGATTTAGAAGCAATGGAAAATTATTATGAAGAAAATAACTAATGATA
CATATGAAAAATAAAAAATTTTTCTTTAATTTCTGAATTCTATGACATCAAATGAA
TTATTAGAAATGAAAAAAGAATATCAAATTAATAAGATTCTGATGTTGTTG
ATGTGTCCAAAAAAGTACTTATACATGATTTTGTATCATCATTACCAGATAAAT
ATGATACCTTAGTAGGTTCCAATGCATCCAATTATCAGGTGGACAAAAACAA
AGAATATCCATTGCAAGAGCAATTATGAGAAAATCCTAAAATTCTAATTCTTG
ATGAAGCTACATCTTCTTTAGATAATAAATCTGAGTATTTAGTACAAAAAAC
AATTAATAATTTGAAAGGAAATGAAAATAGAATAACTATTATTATAGCACATA
GATTAAGTACTATAAGATATGCCAATACAATTTTTGTTTTATCAAATAGAGAA
AGAAGTGATAATAATAATAATAATAATGATGATAATAATAATAATAATAA
TAATAATAATAACAAAATTAATAATGAGGGTAGCTATATTATTGAACAAGGTA
CACATGATAGTCTTATGAAAAATAAAAAATGGTATTTATCATCTTATGATAAAT
AATCAAAAGATTTTATCAAATAAATCTTCAAATAATGGAAATGATAATGGATC
GGATAACAAAAAGTAGCGCTTATAAAGACTCAGATACAGGTAATGATGCAGA
TAATATGAATAGTTTATCAATACATGAAAAATGAAAATATATCAAATAATCGT
AATTGTAAAAATACAGCAGAAAAATGAAAAAGAAGAGAAAGTTCCATTTTTTC
AAAAGAATGTTTAGAAGAAAAAAGAAAGCACCACAAATTTACGTATCATTT
ATAAAGAAATATTTTTTCATATAAAAAAGATGTTACTATAATTTTTCTTTAGTATT

TTAGTAGCTGGAGGATTATATCCCGTATTTGCTTTATTATATGCTAGATATGTA
TCTACATTATTTGATTTTGCAAAATCTAGAATATAACTCAAATAAATATTCTAT
ATATATTCTACTTATTGCTATTGCTATGTTTCATTTTCAGAAACACTCAAAAATA
TTATAACAACAAAATAGGAGAAAAAGTCGAAAAGACTATGAAACGTAGATTA
TTTGAAAATATATTATATCAAGAAATGAGTTTCTTTGATCAAGATAAAAATAC
CCCAGGTGTTTTATCTGCACATATTAATAGAGATGTACATTTATTA AAAACGG
GTTTAGTAAATAATATTGTTATTTTCTCTCATTTTCATAATGCTCTTTCTGGTTAG
CATGGTTATGTCCTTTTATTTTTGTCCAATTGTTGCAGCTGTATTAAC TTTTATA
TATTTTATTAATATGCGGTATTTGCTGTAAGAGCTAGATTAACCAAAAAGTAAA
GAAATTGAGAAAAAAAGAAAATATGTCAACGGAGTTTTTGCATTTAGTTCAGA
TGAATGAAATGTTTAAAGATCCAAGTTTTTAATACAGGAAGCATT TTTTATAATA
TGCATACTGTTATTAATTATGGTTTAGAAGATTATTTCTGTAATTTGATAGAAA
AAGCTATTGATTATAAAAAATAAAGGACAAAAAAGAAGAATTATTGTAAATGC
AGCTTTATGGGGATTCAGTCAAAGCGCTCAATTATTTATTAATAGTT TTTGCCTA
TTGGTTTGGATCCTTCTTAATTA AAAAGAGGTACTATATTAGTTGATGACTTTAT
GAAATCCTTATTTACTTTTATATTTACTGGTAGTTATGCTGGAAAATTAATGTC
CTTAAAAGGAGATTCAGAAAATGCAAAATTATCATTTGAGAAATATTATCCAT
TAATGATTAGAAAATCAAATATTGATGTAAGAGAGATGGTGGAATAAGAATA
AATAAAAATTTAATAAAAAGGGTAAAGTTGATATTAAAGATGTAAATTTCCGTT
ATATTTCAAGACCAAATGTACCTATTTATAAAAATTTATCTTTTACATGTGATA
GTAAAAAACTACAGCAATCGTTGGAGAAACAGGTAGTGGAAAATCAACTTT
TATGAATCTCTTATTAAGATTTTATGACTTGAAAAATGATCACATTATATTA
AAATGATATGACAAATTTTCAAGATTATCAAATAATAATAAATTCATTGG
TTTTAAAAAATGTAAATGAATTTTCAAACCAATCTGGATCTGCAGAAGATTAT
ACTGTATTTAATAATAATGGAGAAATATTATTAGATGATATTAATATATGTGAT
TATAACTTAAGAGATCTTAGAAACTTATTTTCAATAGTTAGTCAAGAACCCAT
GTTATTTAATATGTCCATATATGAAAAATATCAAATTTGGAAGAGAAGATGCA
ACATTGGAAGATGTTAAACGTGTTAGTAAGTTTTGCTGCTATAGATGAATTTAT
CGAATCATTACCAAATAAATATGATACAAATGTTGGACCATATGGTAAAAGCT
TATCAGGGTGGACAAAAACAGAGAATAGCTATAGCTAGAGCATTATTAAGAG
AACCTAAAATATTATTATTAGATGAAGCAACATCATCACTTGATTCCAATTCTG
AGAAATTAATTGAAAAAACTATTTGAGATATTAAAGATAAAGCTGACAAAAC
ATTATTACTATTGCCCCACAGAATTGCATCTATAAAACGATCAGACAAAATTG
TGGTATTTAATAACCCTGATCGAAATGGAACCTTTGTACAGTCACATGGAACA
CACGATGAATTATTATCAGCACAAGATGGAATATATAAAAAAATATGTAAAT
AGCTAAATG

ANEXO 14

Electroferogramas de secuencias de templados obtenidas por secuenciación por Sanger, se observa el ADN de buena calidad, los picos están bien definidos y no se observa ruidos basales, los valores de calidad (QV) son altos para casi todas las bases a lo largo de la secuencia.

