Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

Comparación de los perfiles de deleción en los genes pfhrp2/3 de *Plasmodium falciparum* entre el distrito de Río Santiago (Amazonas) y dos distritos remotos de Loreto

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista
Biotecnólogo

AUTOR

Gerardo Enrique PORRAS LAYMITO

ASESORES

Mg. Giovanna Elizabeth SOTIL CAYCHO

Dra. Dionicia Baziliza GAMBOA VILELA (Coasesor)

Dr. Luis Esteban CABRERA SOSA (Coasesor)

Lima, Perú

2026



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Porras, G. (2026). *Comparación de los perfiles de deleción en los genes pfhrp2/3 de Plasmodium falciparum entre el distrito de Río Santiago (Amazonas) y dos distritos remotos de Loreto*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Genética y Biotecnología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Gerardo Enrique Porras Laymito
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	76123570
URL de ORCID	https://orcid.org/0009-0005-1252-5618
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Giovanna Elizabeth Sotil Caycho
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	25836223
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-1583-8821
Datos de coasesor 1	
Nombres y apellidos	Dionicia Baziliza Gamboa Vilela
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	07478767
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-1420-7729
Datos de coasesor 2	
Nombres y apellidos	Luis Esteban Cabrera Sosa
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	73089368
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-8958-9709
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Olga Bracamonte Guevara

Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	06133853
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Walter Manya Agurto
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09100547
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Edward Valencia Ayala
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	41609605
Datos de investigación	
Línea de investigación	B.1.4.2. Enfermedades transmitidas por vectores
Grupo de investigación	Grupo de Malaria y Enfermedades Emergentes
Agencia de financiamiento	Bélgica. Proyecto de Cooperación Belga para el Desarrollo (DGD) a través del proyecto de Acuerdo Marco 5 (FA5 Perú 2022 - 2026).
Ubicación geográfica de la investigación	Universidad Peruana Cayetano Heredia, Facultad de Ciencias e Ingeniería, Laboratorios de Investigación y Desarrollo, Laboratorio de Malaria: Parásitos y Vectores Edificio: (Si se trata de una investigación en laboratorio, universidad, empresa o institución) País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: San Martín de Porres Latitud: -12.02520 Longitud: -77.056212
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Junio 2024 - Junio 2025
URL de disciplinas OCDE	Enfermedades Infecciosas https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.03.08 Bioquímica, Biología molecular https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO GENETISTA BIOTECNÓLOGO
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN PRESENCIAL DE TESIS)

Siendo las 10:17 horas del 22 de abril de 2026, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del Jurado formado por los profesores que suscriben, se inició la sesión para optar al **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** de **GERARDO ENRIQUE PORRAS LAYMITO.**

Luego de dar lectura y conformidad al expediente **N.º UNMSM-20250140621**, el titulando expuso su Tesis: **COMPARACIÓN DE LOS PERFILES DE DELECIÓN EN LOS GENES PFHRP2/3 DE *Plasmodium falciparum* ENTRE EL DISTRITO DE RÍO SANTIAGO (AMAZONAS) Y DOS DISTRITOS REMOTOS DE LORETO** y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 18, calificativo: Aprobado con mención honrosa

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** a **GERARDO ENRIQUE PORRAS LAYMITO** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo Título, conforme a ley.

Siendo las 11:40 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 22 de abril de 2026.

Mg. OLGA HILDA BRACAMONTE GUEVARA
(PRESIDENTA)

Mg. GIOVANNA ELIZABETH SOTIL CAYCHO
(ASESORA)

Dr. EDWARD VALENCIA AYALA
(MIEMBRO)

Blgo. WALTER FERNANDO MANYA AGURTO
(MIEMBRO)

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, Decana de América

Anexo 1
CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Giovanna Elizabeth Sotil Caycho en mi condición de asesora acreditada con el **Dictamen de la Escuela Profesional N° 004-2026-EPGBT-FCB/UNMSM** de la tesis cuyo título es: Comparación de los perfiles de deleción en los genes pfhrp2/3 de *Plasmodium falciparum* entre el distrito de Río Santiago (Amazonas) y dos distritos remotos de Loreto, presentado por el Bachiller Sr. Gerardo Enrique PORRAS LAYMITO para optar al Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo,

CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante la plataforma PIDS, el documento evaluado cuenta con el 11% de similitud, nivel PERMITIDO para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional.**

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo.

Lima, 07 de abril de 2026

Giovanna Elizabeth Sotil Caycho
DNI 25836223

La vigencia del presente certificado corresponde a un período de noventa (90) días desde la fecha de su emisión; siempre que no haya observaciones en el texto durante el proceso de revisión por el jurado informante o surja alguna contingencia.

DEDICATORIA

A mis padres: el Sr. Felipe Porras y la Sra. Celia Laymito

A mis hermanos: Beatriz, Rosario, Eduardo y Álvaro

A mis sobrinitos: Dylan, Adriano y Liam

AGRADECIMIENTOS

A la Mg. Giovanna Sotil, por aceptar ser mi asesora interna y brindarme su guía y experiencia en este proceso. Desde mis años de pregrado siempre admiré su capacidad para explicar con claridad conceptos complejos y su trato amable hacia nosotros, por lo que no dudé en elegirla.

A la Dra. Dionicia Gamboa, por su asesoría y por recibirme desde el primer día en su laboratorio con calidez haciendo que me sienta parte del equipo. En estos años me ha demostrado una confianza en mis capacidades y potencial incluso mayor que la que yo mismo me tenía, ayudándome a crecer profesionalmente. Admiro su visión y perseverancia para impulsar nuevos proyectos, así como su apoyo incondicional para que mi tesis contara con todos los recursos posibles. Gracias a su guía y ejemplo, he descubierto habilidades que no sabía que poseía y he aprendido que, incluso cuando los resultados no son los esperados, siempre existen nuevas oportunidades para continuar.

Al Dr. Luis Cabrera, por su mirada crítica y su disposición constante para orientar y responder mis consultas. Su asesoría, sus observaciones y sugerencias han impulsado a mejorar mi capacidad de análisis y han contribuido significativamente a mejorar este trabajo.

A la Dra. Stella Chenet, directora del Instituto de Enfermedades Tropicales (IET) de la Universidad Toribio Rodríguez de Mendoza y a Milagros Saavedra por su valiosa colaboración al facilitarme las muestras procedentes de la región de Amazonas, sin las cuales esta tesis no habría podido desarrollarse.

A la Dra. Katherine Torres, investigadora principal del proyecto FIND-ABBOTT, por su permanente disposición para orientar y motivar, brindándome consejos que contribuyeron a mi crecimiento profesional y por permitirme realizar esta investigación con las muestras procedentes de la provincia del Datem del Marañón.

A todos los miembros de los laboratorios 308, 309 y 401 del LID. Particularmente, agradezco a Pamela Rodríguez, por su disposición constante para ayudarme a resolver cualquier problema con calma, su positivismo y por siempre contar conmigo ante cualquier eventualidad. A Jhon Zumaeta, por su apoyo incondicional, por las discusiones y consejos que me ayudaron a mejorar continuamente, y por su gran compañerismo en este camino. A la profesora Irene Delgado de la Flor y a Daniela Nacarino, por las valiosas discusiones académicas sobre este tema que enriquecieron mis conocimientos y, por supuesto esta tesis. También extiendo mi agradecimiento a Carlos Acosta por sus observaciones valiosas en la parte estadística de este trabajo y a todo el equipo de Malaria, porque de cada uno de ustedes he aprendido algo nuevo. No quiero olvidarme de Cristina Burga y Freddy Alava, quienes me ayudaron a conocer la realidad de la malaria en comunidades remotas de la selva peruana, experiencia que amplió mi perspectiva y ayudó significativamente a este trabajo. Tampoco de Erick Figueroa, quien me guio en los primeros pasos de esta investigación.

A mis amigos Andrés Cuba, Víctor Otárola, Álvaro Munaylla, Lady Trinidad y Nedda Espinoza, por escucharme en los momentos claves.

A mi compañerita de metas y sueños Merly Yarleque, por motivarme a seguir adelante y darse siempre su tiempo para comentar nuestros problemas del día a día, por animarme a continuar a pesar de las dificultades de la vida. Tu apoyo emocional ha sido fundamental para mantenerme enfocado.

Finalmente, agradezco a todas las personas y experiencias que, de una u otra manera, contribuyeron a la realización de este trabajo. Este trabajo no hubiera sido posible sin su ayuda. Cada gesto de apoyo ha sido fundamental en este proceso, que concluye aquí como tesis.

FUENTE DE FINANCIAMIENTO

El presente trabajo de tesis fue financiado por el Proyecto de Cooperación Belga para el Desarrollo (DGD) a través del proyecto de Acuerdo Marco 5 (FA5 Perú 2022 - 2026), el cual proporcionó la adquisición de reactivos, la cobertura de los gastos asociados a los procedimientos realizados, el uso de las instalaciones de la Unidad de Epidemiología Molecular, así como el estipendio del tesista durante todo el desarrollo de la investigación.

ABREVIATURAS

pfhrp2/3: Genes que codifican a la proteína rica en histidina 2 y 3

PDRs: Pruebas de Diagnóstico Rápido

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

LOD: Límite de detección

OMS: Organización Mundial de la Salud

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

MINSA: Ministerio de Salud

HRP2: Proteína rica en histidina 2

HRP3: Proteína rica en histidina 3

CIEI: Comité de Ética en Investigación

PAMAFRO: Proyecto Control de Malaria en Zonas Fronterizas

pALD: Prueba rápida basada en la proteína Aldolasa

pLDH: Prueba rápida basada en la proteína Lactato deshidrogenasa

pfHRP2: Prueba rápida basada en la proteína HRP2

qPCR: PCR cuantitativa

AmpliSeq: Amplicon Deep Sequencing

dNTPS: Desoxinucleótido trifosfatos

ddNTPs: Didesoxinucleótidos trifosfatos

SDS: Dodecil Sulfato de Sodio

NGS: Secuenciación de Nueva Generación

pb: Pares de base

RESUMEN 1

ABSTRACT 2

I. INTRODUCCIÓN 3

II. MARCO TEÓRICO 6

II.1. Generalidades 6

II.2. Ciclo de vida del parásito *Plasmodium* 6

II.3. Epidemiología del *P. falciparum* en el Perú 8

II.4. Métodos de diagnóstico de la malaria 9
II.4.1. Gota gruesa y frotis de sangre 10
II.4.2. Pruebas de diagnóstico rápido (PDRs) 11

II.5. Genes *pfhrp2* y *pfhrp3* 12

II.6. Deleciones en los genes *pfhrp2/3* en Sudamérica 16

II.7. Técnicas moleculares para la detección de deleciones *pfhrp2/3* 20

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 24

III.1. Hipótesis 24

III.2. Objetivos 24

III.3. Variables 25

IV. MATERIALES Y MÉTODOS 26

IV.1. Área de estudio 26

IV.2. Diseño de investigación 29

IV.3. Obtención de muestras y aspectos éticos 31
IV.3.1. Muestra hemática en papel filtro 32
IV.3.2. Muestra hemática en *microtainers* 32
IV.3.3. Muestras de ADN 32

IV.4. Extracción de ADN 33

IV.5. Estandarización de la amplificación del exón 1 de los genes *pfhrp2/3* mediante PCR convencional 34

IV.6. Sensibilidad para la detección de la presencia de los genes *pfhrp2/3* mediante PCR convencional 36

IV.7. Límite de detección (LOD) y cuantificación mediante PCR en tiempo real 36

IV.8. Genotipificación de los genes *pfhrp2/3* y sus regiones flanqueantes 38
IV.8.1. Genotipificación enfocada en el exón 1 38
IV.8.2. Genotipificación enfocada en el exón 2 38
IV.8.3. Genotipificación de las regiones flanqueantes 39

IV.9. Determinación de la frecuencia de la deleción en los genes *pfhrp2/3* enfocados en el exón 1 y 2, y sus regiones flanqueantes. 40

IV.10. Variación de perfiles en los genes *pfhrp2/3* por distrito 41

IV.11. Variación entre los protocolos de PCR convencional que detectan el exón 1 y el exón 2 de los genes *pfhrp2/3*. 41

V. RESULTADOS 43

V.1. Estandarización del protocolo de detección del exón 1 para los genes *pfhrp2/3* mediante PCR convencional 43
V.1.1. Gen *pfhrp2* 43
V.1.2. Gen *pfhrp3* 44

V.2. Especificidad de hibridación de los *primers* en el exón 1 de los genes *pfhrp2/3* 45

V.3. Sensibilidad de detección del gen *pfhrp2* (exón 1) mediante PCR convencional 48

V.4. Límite de detección (LOD) mediante PCR en tiempo real 49

V.5. Genotipificación del gen *pfhrp2* y su comparación mediante los protocolos de amplificación enfocados en los exones 1 y 2. 52

V.6. Genotipificación del gen *pfhrp3* 55

V.7. Genotipificación de las regiones flanqueantes 57

V.8. Caracterización de las deleciones en los genes *pfhrp2/3* y sus regiones flanqueantes 58

V.9. Reporte de los perfiles de caracterización de las deleciones en los genes *pfhrp2/3* entre el distrito de Río Santiago y los distritos de la región de Loreto 59

VI. DISCUSIÓN 60

VII. CONCLUSIONES 68

VIII. RECOMENDACIONES 69

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 70

X. ANEXOS 80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida del parásito *Plasmodium sp*.

Figura 2. Ubicación de los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* y sus regiones flanqueantes

Figura 3. Puntos de corte en las diferentes regiones de los genes *pfhrp2/3*.

Figura 4. Ubicación de los *primers* utilizados por diferentes autores para caracterizar deleciones en los genes *pfhrp2/3*.

Figura 5. Ubicación de las comunidades donde se colectaron muestras positivas de *P. falciparum*, situadas en los distritos de Río Santiago (Amazonas), Andoas y Trompeteros (Loreto).

Figura 6. Flujograma de trabajo

Figura 7. Amplificación del exón 1 en el gen *pfhrp2* utilizando el protocolo estandarizado en este estudio

Figura 8. Amplificación del exón 1 en el gen *pfhrp3* utilizando el protocolo estandarizado en este estudio

Figura 9. Ensayo de descarte de inespecificidad de los *primers* enfocados en el exón 1 del gen *pfhrp3*

Figura 10: Diluciones para determinar la sensibilidad de la PCR

Figura 11. Curva estándar para la cuantificación de parásitos *P. falciparum*

Figura 12. Distribución de los perfiles de caracterización del gen *pfhrp2* por cada distrito estudiado.

Figura 13: Frecuencia de presencia y ausencia del gen *pfhrp3* (exón 2) en los tres distritos estudiados.

Figura 14: Estructura de las regiones flanqueantes del gen *pfhrp2* (cromosoma 8) y su distribución en Río Santiago y Andoas

Figura 15: Estructura de las regiones flanqueantes del gen *pfhrp3* (cromosoma 13) y su distribución en Río Santiago y Andoas

Figura 16. Diversidad de los perfiles genéticos entre los distritos de Río Santiago y Andoas

Figura 17. Frecuencia de los perfiles de caracterización enfocados en los genes *pfhrp2* y *pfhrp3*

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las posibles causas de un resultado falso negativo en las PDRs

Tabla 2. Frecuencia de las deleciones en los genes *pfhrp2*, *pfhrp3* y sus regiones flanqueantes en muestras de *P. falciparum* colectadas en el Perú por orden cronológico.

Tabla 3: Ventajas y desventajas de las metodologías de PCR enfocadas en la amplificación de los genes *pfhrp2/3*

Tabla 4. Coordenadas de las 17 comunidades pertenecientes a las dos regiones de estudio.

Tabla 5. *Primers* utilizados para la amplificación del exón 1 en los genes *pfhrp2/3.*

Tabla 6. Dilución seriada de la cepa 3d7 con concentración conocida (parásitos/µL)

Tabla 7. Secuencia de *primers* utilizados en la PCR en tiempo real con sondas Taqman para la identificación de *P. falciparum*

Tabla 8. Dilución seriada de una muestra con concentración conocida (parásitos/µL)

Tabla 9. Caracterización de los perfiles genotípicos de los genes *pfhrp2*/*3* según la amplificación de sus dos exones.

Tabla 10. Criterio de caracterización de las deleciones según la amplificación de los exones en *pfhrp2/3*

Tabla 11. Códigos de accesión con mayor similitud a la secuencia consenso del gen *pfhrp2* (exón 1) analizada mediante BLASTn

Tabla 12. Primeros resultados del alineamiento de los *primers forward* y *reverse* del exón 1 del gen *pfhrp3* contra el genoma humano

Tabla 13. Curva de dilución para estimar el Límite de Detección

Tabla 14. Parasitemia promedio (parásitos/µL) en muestras positivas a *P. falciparum* según su región de procedencia.

Tabla 15. Resultados de la prueba exacta de Fisher con corrección de Bonferroni para la comparación de frecuencias de deleciones del gen *pfhrp2* entre distritos.

Tabla 16. Matriz de contingencia que muestra la concordancia entre ambos protocolos de detección del gen *pfhrp2* (índice *kappa* = 0.656)

Tabla 17: Distribución de la presencia y ausencia del gen *pfhrp3* (exón 2) en los distritos evaluados.

Tabla 18: Resultados de la prueba exacta de Fisher con corrección de Bonferroni para la comparación de las frecuencias de deleciones del gen *pfhrp3* (exón 2) entre distritos.

RESUMEN

Las regiones de Loreto y Amazonas tuvieron la mayor tasa de malaria en el Perú en el 2024. Dentro de la región Amazonas, el distrito de Río Santiago representó el 95% de los casos de infecciones de la región. En Loreto, el distrito de Andoas y el de Trompeteros representaron zonas con altas tasas de infección por reportes anteriores. Desde el 2010, en Loreto se reportaron parásitos de *P. falciparum* con deleciones en los genes *pfhrp2* y *pfhpr3* (*pfhrp2/3*). Estas deleciones conducen a resultados falsos negativos en las Pruebas de Diagnóstico Rápido (PDRs) y, en consecuencia, impiden el tratamiento adecuado de los pacientes infectados. Hasta el momento, solo se ha realizado un estudio molecular en relación con la frecuencia de deleciones en muestras de Amazonas. Este estudio buscó comparar los perfiles de deleción en los genes *pfhrp2/3* de *P. falciparum* entre el distrito de Río Santiago (Amazonas) y otros dos distritos remotos de Loreto, mediante la aplicación de un protocolo de genotipificación dirigido hacia los exones 1 y 2. Se evaluaron un total de 142 muestras pertenecientes a Río Santiago, Andoas y Trompeteros entre 2019 y 2023. Se realizó la cuantificación absoluta utilizando el gen 18S rRNA a través de PCR en tiempo real para determinar la parasitemia. La presencia de los genes *pfhrp2/3* se determinó mediante PCR convencional enfocado en ambos exones. Se registraron diferencias significativas entre los distritos estudiados, reportando un único genotipo (100%) con doble deleción en *pfhrp2/3* en Río Santiago. Además, el distrito de Trompeteros fue el único en el que se reportó deleciones parciales en el gen *pfhrp2* (35.1%). Este estudio resalta la necesidad de complementar los métodos de PCR para una mejor genotipificación estructural y de reconsiderar los diagnósticos con PDRs realizados en el distrito de Río Santiago por su alta prevalencia de dobles deleciones.

Palabras clave: *pfhrp2/3*, deleción, *P. falciparum*, malaria, Amazonas

ABSTRACT

The Loreto and Amazonas regions had the highest malaria rates in Peru in 2024. Within the Amazonas region, the district of Río Santiago accounted for 95% of the reported infections. In Loreto, the districts of Andoas and Trompeteros represented areas with high infection rates based on previous reports. Since 2010, *P. falciparum* parasites with deletions in the *pfhrp2* and *pfhrp3* genes (*pfhrp2/3*) have been reported in Loreto, leading to false-negative results in Rapid Diagnostic Tests (RDTs) and consequently hindering the appropriate treatment of infected patients. To date, only one molecular study has been conducted regarding the frequency of deletions in samples from Amazonas. This study aimed to compare the deletion profiles of *P. falciparum pfhrp2/3* genes between the district of Río Santiago (Amazonas) and two other remote districts in Loreto, using a genotyping protocol targeting exon 1. A total of 142 samples from Río Santiago, Andoas, and Trompeteros collected between 2019 and 2023 were evaluated. Absolute quantification was performed using the 18S rRNA gene through real-time PCR to determine parasitemia. The presence of the pfhrp2 and pfhrp3 genes was determined by conventional PCR targeting both exons. Significant differences were observed among the districts studied, with a single genotype (100%) carrying double *pfhrp2/3* deletions reported in Río Santiago, while Trompeteros was the only district in which partial deletions in the *pfhrp2* gene (35.1%) were detected. This study highlights the need to complement PCR methods for improved structural genotyping and to reconsider the use of RDT-based diagnostics in Río Santiago due to its high prevalence of double deletions.

Keywords: *pfhrp2/3*, deletion, *P. falciparum*, malaria, Amazonas

I. INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad parasitaria potencialmente mortal, endémica de zonas tropicales, que se transmite al humano por el vector biológico *Anopheles sp.* (Fontaine et al. 2016). Esta infección es causada por el parásito del género *Plasmodium* (WHO, 2024a). Según los últimos reportes, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó en el 2023 un total de 263 millones de casos, 11 millones más que en el 2022 (WHO, 2024b).

En el Perú, la malaria es considerada una enfermedad endémica y reemergente de la región Loreto, zona que abarca gran parte de la Amazonía peruana, aunque también se ha reportado en regiones aledañas como Amazonas, Junín y San Martín (MINSA, 2024). Sin embargo, el control y la eliminación de la enfermedad se ven limitados por la presencia de zonas con acceso restringido a servicios de salud, infraestructura sanitaria deficiente y dificultades para la distribución de medicamentos en áreas remotas, fronterizas y de difícil acceso, donde incluso la vigilancia es escasa. Esto conlleva a que dichas comunidades puedan convertirse en reservorios perennes de transmisión.

Las especies predominantes en nuestro país son dos: *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*. En el 2024, el Ministerio de Salud (MINSA) reportó un total de 27756 casos de *P. vivax* (81.9%) y 6135 casos de *P. falciparum* (18.1%) (MINSA, 2024). Aunque *P. vivax* es responsable de la mayoría de infecciones, *P. falciparum* se asocia con formas más severas de la enfermedad, por lo que su infección suele denominarse “Malaria grave” (MINSA, 2007). A pesar de los esfuerzos implementados a través de diversos programas nacionales de control y eliminación (ORAS-CONHU 2009, Malaria Cero 2017, GRL 2024), el número de casos ha mostrado un incremento en los últimos años.

La región de Loreto es el principal foco de transmisión de malaria en el país, concentrando la gran mayoría de los casos notificados anualmente (MINSA, 2024). No obstante, la región de Amazonas presenta la segunda mayor proporción de infecciones por *P. falciparum* (1.7%) en el país, concentrando cerca del 95% de los casos en el distrito de Río Santiago. Esta es una zona remota y de difícil acceso que mantuvo esta tendencia entre 2015 y 2019 y que, para el 2020 reportó un brote con un incremento de casos de 2.5 veces (Montenegro et al. 2021, MINSA, 2023).

Realizar un diagnóstico rápido y preciso de la malaria constituye un componente esencial de las estrategias de control y eliminación, pues permite un manejo oportuno y eficaz de los casos para reducir su transmisión (WHO, 2010). La OMS recomienda el uso de una confirmación parasitológica mediante microscopía o Pruebas de Diagnóstico Rápido (PDRs) para las naciones afectadas con la enfermedad (Cheng et al. 2014). Las PDRs están basadas en la detección de diferentes marcadores antigénicos; no obstante, la gran mayoría están diseñadas para identificar la proteína rica en histidina 2 (HRP2), y la histidina 3 (HRP3), debido a su homología con HRP2 (Gendrot et al. 2022). Estas proteínas, específicas de *P. falciparum,* se expresan en niveles altos durante la mayor parte de su ciclo asexual y están codificadas por los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* (*pfhrp2/3*), respectivamente (Poti et al. 2020). Sin embargo, desde el 2010, la eficacia de las PDRs basadas en HRP2 se ha visto comprometida por la aparición de parásitos *P. falciparum* con deleciones en los genes *pfhrp2/3* en muestras de la Amazonía peruana colectadas entre 2003 y 2007 (Gamboa et al. 2010). Dicho estudio incluyó muestras provenientes del distrito de Río Santiago, en la región Amazonas, constituyendo el primer y único reporte de deleciones de esta zona, pese a que actualmente esta zona constituye un foco creciente de transmisión de estos parásitos.

La identificación y caracterización de estos parásitos continúa siendo un desafío. En el Perú, el diagnóstico de la malaria se basa principalmente en la microscopía, que

requiere personal capacitado para la lectura de las muestras (MINSA, 2024). Esto limita su aplicación en zonas remotas y de difícil acceso, por lo que se recurre al uso de las PDRs. Dicho escenario se complica ante el incremento de reportes de *P. falciparum* con deleción en los genes *pfhrp2/3* en diferentes comunidades de la región de Loreto, detectadas mediante metodologías moleculares. No obstante, aún se desconoce si estas deleciones presentan un perfil genotípico similar en otras áreas aledañas a la región de Loreto, como Río Santiago (Montenegro et al. 2021).

Ante esta situación, resulta necesario evaluar si existen diferencias en la frecuencia y el perfil de deleciones entre distritos remotos ubicados en las regiones de Loreto y Amazonas. En la actualidad, los protocolos implementados en el país se enfocan únicamente en el exón 2 de los genes *pfhrp2/3,* lo que limita una caracterización genotípica de parásitos con deleción. Por ello, este estudio tiene como propósito comparar los perfiles de deleción en ambos genes de *P. falciparum* entre el distrito de Río Santiago y otros dos distritos remotos de Loreto, para lo cual se estandarizó y validó un protocolo de genotipificación dirigido al exón 1, luego se caracterizaron los perfiles genéticos de las muestras procedentes de ambas zonas y se evaluó la concordancia entre los protocolos de PCR orientados al exón 1 y al exón 2. En conjunto, este abordaje permitirá obtener una caracterización más completa y precisa de las deleciones y sus variantes circulantes en estas regiones.

II. MARCO TEÓRICO

II.1. Generalidades

La malaria es una enfermedad infecciosa causada por parásitos protozoarios del género *Plasmodium,* y transmitida al ser humano por mosquitos del género *Anopheles* (Rougeron et al. 2022, Sima-Biyang et al. 2024). Estos parásitos tienen la facultad de infectar a diferentes vertebrados (Sato, 2021), y actualmente se han descrito más de 200 especies dentro del género. Sin embargo, solo 5 de ellas infectan a los humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* y *Plasmodium knowlesi* (Sato 2021).

Desde el punto de vista taxonómico, los parásitos del género *Plasmodium* son organismos eucariotas unicelulares pertenecientes al dominio Eukaryota, reino Protista, filo Apicomplexa, clase Aconoidasida, orden Haemosporida, familia Plasmodiidae y género *Plasmodium*. Una característica distintiva de este grupo es la presencia del complejo apical, una estructura especializada que desempeña un papel esencial en la invasión de las células del huésped (Phillips et al. 2017).

II.2. Ciclo de vida del parásito *Plasmodium*

Todas las especies del género *Plasmodium* tienen un ciclo de vida dividido en dos fases: una fase asexual que involucra al ser humano como hospedador intermediario, y una fase sexual, que se desarrolla en la hembra del mosquito *Anopheles* como hospedador definitivo (Perkins 2014).

El ciclo empieza con la fase pre-eritrocítica (hepática), durante la cual los parásitos (denominados esporozoitos), desarrollados en la hembra del mosquito *Anopheles* infectada, son inoculados en el torrente sanguíneo del huésped durante la picadura (Frischknecht & Matuschewski 2017). Desde la dermis, los esporozoitos migran hacia

el hígado e invaden los hepatocitos, donde se multiplican asexualmente mediante un proceso denominado esquizogonia (Prudêncio, Rodriguez, & Mota 2006). Como resultado, se forman numerosos merozoitos que, tras la ruptura de los hepatocitos, son liberados al torrente sanguíneo, para iniciar la infección de los eritrocitos (Sturm et al. 2006).

En la fase eritrocítica (sanguínea), los merozoitos se multiplican asexualmente dentro de los eritrocitos, también mediante esquizogonia, generando entre 8 y 64 nuevos dependiendo de la especie (Gerald, Mahajan & Kumar 2011). Esta fase comprende tres etapas morfológicas: anillo, trofozoíto y esquizonte. Posteriormente, los merozoitos liberados invaden nuevos eritrocitos, repitiendo el ciclo en intervalos característicos de cada especie: cada 24 horas en *P. knowlesi*, 48 horas en *P. falciparum*, *P. ovale* y *P. vivax*, y 72 horas en *P. malariae*. Durante esta fase se expresan los síntomas clínicos de la malaria como fiebre, dolor de cabeza y escalofríos (OPS, 2024).

En paralelo, una fracción de los parásitos se diferencia en gametocitos, proceso conocido como gametogénesis, cuya dinámica depende también de la especie. Por ejemplo, en *P. falciparum* se tiene que completar muchos ciclos de propagación eritrocíticos antes de diferenciarse, mientras que en *P. vivax* se pueden diferenciar incluso desde los primeros ciclos (Bennink et al. 2016).

La segunda parte del ciclo de vida ocurre en el mosquito vector, que se infecta al ingerir sangre con gametocitos del huésped infectado. En el lumen del intestino del mosquito, los gametocitos se activan y se diferencian en microgametos (masculinos) y macrogametos (femeninos), los cuales se fusionan para formar un cigoto diploide (Bennink et al. 2016). Este cigoto sufre meiosis y se transforma en un oocineto haploide (Sinden & Hartley, 1985), que atraviesa la pared intestinal y se convierte en un ooquiste en la superficie externa del intestino (Siciliano et al. 2020). Dentro del

ooquiste, el parásito experimenta varias rondas de mitosis produciendo numerosos esporozoitos. Una vez que el ooquiste madura, se rompe y genera la liberación de los esporozoitos hacia las glándulas salivales, el cual tiene la capacidad de infectar células humanas completando el ciclo (Figura 1) (Smith & Jacobs-Lorena, 2010).

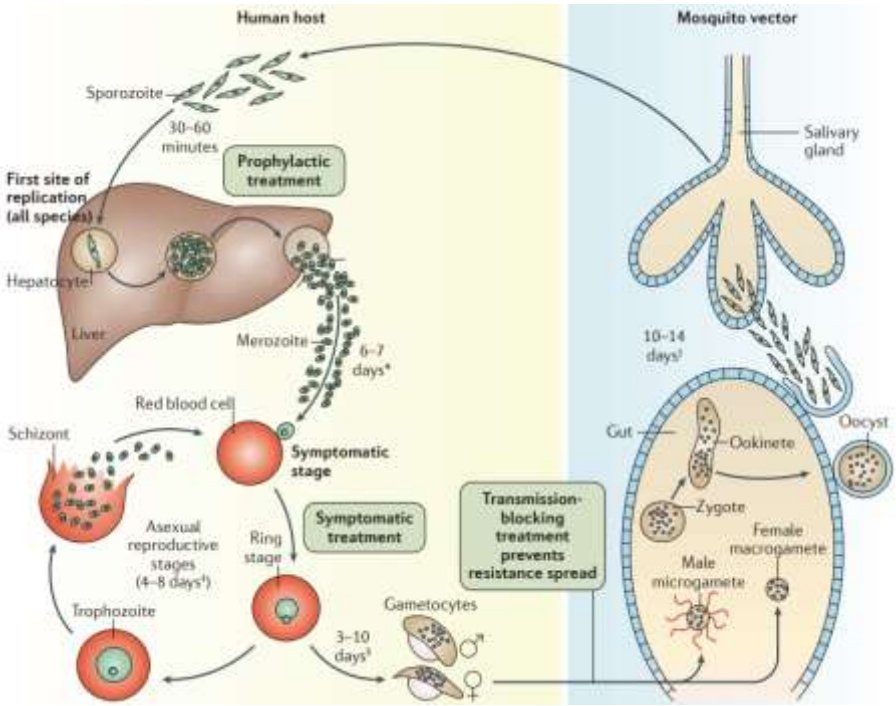


Figura 1. Ciclo de vida del parásito *Plasmodium.* Se muestra el hospedador intermediario (humano) y al definitivo (mosquito) de la malaria (Imagen tomada de Phillips et al. 2017).

II.3. Epidemiología del *P. falciparum* en el Perú

P. falciparum es reconocido por ser el parásito de mayor prevalencia y mortalidad de la malaria en el continente africano (WHO, 2024a). Además, es responsable de los mayores casos de malaria grave y muertes a nivel mundial, especialmente en regiones con clima tropical, debido a que esta condición ambiental favorece su transmisión (Kumar et al. 2020).

En el Perú, la transmisión de la malaria se concentra principalmente en la Amazonía, especialmente en la región de Loreto. Las condiciones de la Amazonía sudamericana

se caracterizan por presentar altos índices de humedad constante, altas temperaturas y existencia de cuerpos de agua estancada que pueden favorecer a la reproducción de los mosquitos vectores del género *Anopheles* (OPS, 2021). Históricamente, la región de Loreto se ha caracterizado por ser la zona con más del 90% de casos de infecciones por malaria en el país (Carey, 2016). Los casos de *P. falciparum* representan una proporción significativa (18%), siendo la segunda especie con mayor prevalencia de infecciones, después del *P. vivax* (MINSA, 2024).

Desde el año 2023, las regiones de Loreto y Amazonas presentaron más del 95% de infecciones por *P. falciparum* (DGE, 2025). Este escenario representa un cambio notable en Amazonas si se considera que, hasta el 2018, la región registraba como máximo cuatro casos anuales desde la finalización programa de control PAMAFRO (2010). El incremento observado en los años siguientes evidenció un brote significativo de la transmisión de este parásito llevando a reportar miles de casos (Montenegro et al. 2021).

II.4. Métodos de diagnóstico de la malaria

Entre los criterios de la OMS, se consideran dos aspectos principales para el diagnóstico de la malaria: la sintomatología y la presencia del parásito (Phillips et al. 2017). Para detectar la presencia del parásito, la OMS recomienda el uso de pruebas diagnósticas en individuos sospechosos de malaria (WHO, 2024a). Por lo tanto, se recomiendan las pruebas basadas en un examen microscópico como gota gruesa, frotis de sangre; y las serológicas como las PDRs.

Inicialmente se pensaba que al presentar mayor parasitemia, la malaria era más grave. Sin embargo, esta correlación aún es imprecisa (Phillips et al. 2017). Las personas con malaria en un estado “no complicado” usualmente tienen entre 1000 a 5000 parásitos por microlitro de sangre (parásitos/μL). En un análisis que buscó

conocer la parasitemia de cada zona geográfica endémica en el mundo, se obtuvo un promedio de aproximadamente 4000 parásitos/µL en América del Sur, 10000 parásitos/µL en Asia, y 20000 parásitos/µL en África (WWARN, 2015).

II.4.1. Gota gruesa y frotis de sangre

El examen microscópico de frotis sanguíneo con tinción Giemsa es el método de diagnóstico más utilizado y recomendado por la OMS. Constituye la técnica de rutina conocida como el "estándar de oro" (*gold standard*) para la detección de malaria. Este análisis comprende dos modalidades complementarias: la gota gruesa, utilizada para cuantificar la parasitemia, y el frotis delgado, empleado para la identificación de la especie de *Plasmodium* (Baird et al. 2016).

Entre las principales ventajas de esta técnica se destacan su bajo costo y la capacidad de proporcionar información detallada sobre la densidad parasitaria y la especie infectante, en comparación con las PDR (Cheng et al. 2014). Sin embargo, su sensibilidad depende directamente de la experiencia del observador. Así, el límite de detección estimado para microscopistas expertos es de ~10 a 20 parásitos/µL, mientras que para los de rutina pueden llegar a un máximo de 50 parásitos/µL (Rougemont et al. 2004, Baird et al. 2016).

La detección de infecciones con baja parasitemia es importante, ya que estas pueden incrementar hasta 20 veces durante el ciclo de vida del parásito y dar lugar a recaídas clínicas o infecciones asintomáticas (Phillips et al. 2017). No obstante, la microscopía presenta limitaciones importantes en áreas remotas debido a la necesidad de microscopios, reactivos en óptimas condiciones y personal altamente capacitado, además de su baja sensibilidad ante infecciones submicroscópicas (Nateghpour et al. 2012).

II.4.2. Pruebas de diagnóstico rápido (PDRs)

Estas pruebas constituyen ensayos inmunocromatográficos diseñados para detectar antígenos del parásito en muestras de sangre mediante el reconocimiento inmunológico de anticuerpos específicos (Phillips et al. 2017). Su principal ventaja radica en la rapidez y facilidad de uso, lo que posibilita un diagnóstico oportuno y un tratamiento inmediato, especialmente en zonas remotas donde la microscopía o las pruebas moleculares, no son accesibles (Murray et al. 2008).

Entre las PDRs disponibles a nivel mundial se encuentran aquellas que detectan antígenos pan-específicos, como lactato deshidrogenasa (pLDH) y aldolasa (pALD), los cuales permiten identificar la presencia de parásitos del género *Plasmodium* (Gendrot et al. 2022). Sin embargo, la mayoría de las PDRs comercializadas están diseñadas para detectar *P. falciparum*, enfocándose en la detección de la proteína HRP2, codificada por el gen *pfhrp2* y secretada durante la etapa asexual del parásito (Wurtz et al. 2013, McCaffery et al. 2021).

A pesar de su practicidad y que no requieren de personal altamente especializado, las PDRs presentan ciertas limitaciones (Tabla 1), como una sensibilidad inferior a las pruebas moleculares y falsos negativos en infecciones con baja parasitemia. La limitación más crítica se observa en los falsos negativos producidos por deleciones en los genes *pfhrp2/3*, los cuales impiden la detección de *P. falciparum* mediante pruebas basadas en HRP2, comprometiendo su eficacia diagnóstica (Gendrot et al. 2022).

Tabla 1. Clasificación de las posibles causas de un resultado falso negativo en las PDRs (Adaptado de Cheng et al. 2014).

Clasificación	Causa del resultado falso negativo
Diseño o calidad del producto	● Sensibilidad de detección deficiente debido a la deficiente especificidad o afinidad o a una cantidad insuficiente de anticuerpos utilizados por la PDR. ● Mala visibilidad de las bandas debido al color de fondo.
Condiciones de transporte o almacenamiento	● Degradación de los anticuerpos debido a la exposición al calor o formas incorrectas de almacenamiento.
Factores parasitarios	● Variación en la secuencia de aminoácidos del epítopo al que se dirige el anticuerpo monoclonal. ● Parásitos que carecen de los antígenos diana o que expresan niveles reducidos de estos (pj. pfHRP2).
Densidad del parásito huésped	● Parasitemias muy bajas. ● Efecto prozona: hiperparasitemia que genera sobrecarga de antígenos.

II.5. Genes *pfhrp2* y *pfhrp3*

El gen *pfhrp2* (1064 pb) se localiza en el cromosoma 8, mientras que el gen *pfhrp3* (977 pb) en el cromosoma 13 (Akinyi et al. 2015, Kaaya et al. 2022). Ambos genes se ubican en regiones subteloméricas, junto con familias multigénicas, y presentan una estructura compuesta por dos exones separados por un intrón (Figura 2) (Sullivan, Ayala & Goldberg, 1996). El exón 2 de ambos genes, se caracteriza por codificar secuencias ricas en histidina, mientras que el exón 1 lo hace con secuencias de señal y de escisión. Si bien ambos exones presentan zonas ricas en histidinas, las principales se encuentran en el exón 2 (Poti et al. 2020).

Las proteínas ricas en histidina 2 y 3 (HRP2 y HRP3, respectivamente) son codificadas por el gen *pfhrp2* y su homólogo *pfhrp3*. Estos tienen la característica de ser solubles y se secretan en el torrente sanguíneo en la fase eritrocítica del *P. falciparum*. Ambos se expresan en altos niveles durante fases tempranas y presentan

una correcta estabilidad (Poti et al. 2020), lo que conllevó a ser un biomarcador ideal para las PDRs.

La primera evidencia de cepas de *P. falciparum* con deleciones en estos genes se reportó en líneas clonadas adaptadas a cultivo *in vitro*. La cepa Dd2 originaria de Tailandia, presentó una deleción en *pfhrp2* (Walker-Jonah et al. 1992), mientras que la cepa HB3, proveniente de Honduras, mostró deleción en *pfhrp3* (Wellems et al. 1987). Estas deleciones se atribuyeron a roturas en los extremos de los cromosomas, es decir, en las regiones subteloméricas. Por otro lado, se experimentaron cruces de ambas líneas teniendo como resultado a filiales con doble deleción (Walker-Jonah et al. 1992).

Posteriormente, Scherf & Mattei (1992) propusieron que la deleción del gen *pfhrp2* podría deberse a un proceso de “curación” de telómeros, mediante el cual se elimina el extremo de un cromosoma y se reemplaza por una secuencia de repetición telomérica en el punto de rotura. De manera similar, se observó curación telomérica en *pfhrp3*, además de eventos de recombinación entre el cromosoma 13 y los cromosomas 11 y 5 (MalariaGEN et al. 2023). Estudios genómicos recientes confirman que las deleciones pueden ser completas o parciales, afectando incluso los genes flanqueantes (Figura 3).

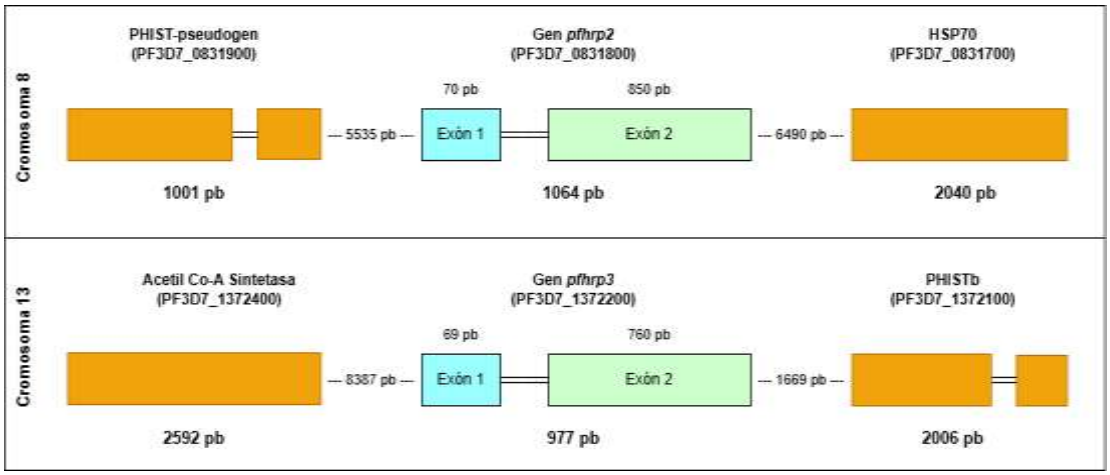


Figura 2. Ubicación de los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* y sus regiones flanqueantes. Se muestra la longitud de cada exón y la distancia que separa de las regiones flanqueantes de cada uno. PF3D7_0831900 y PF3D7_1372400 son regiones *upstream* de *pfhrp2* y *pfhrp3,* respectivamente. PF3D7_0831700 y PF3D7_1372100 son regiones *downstream* de los mismos genes, respectivamente (Figura adaptada del NCBI).

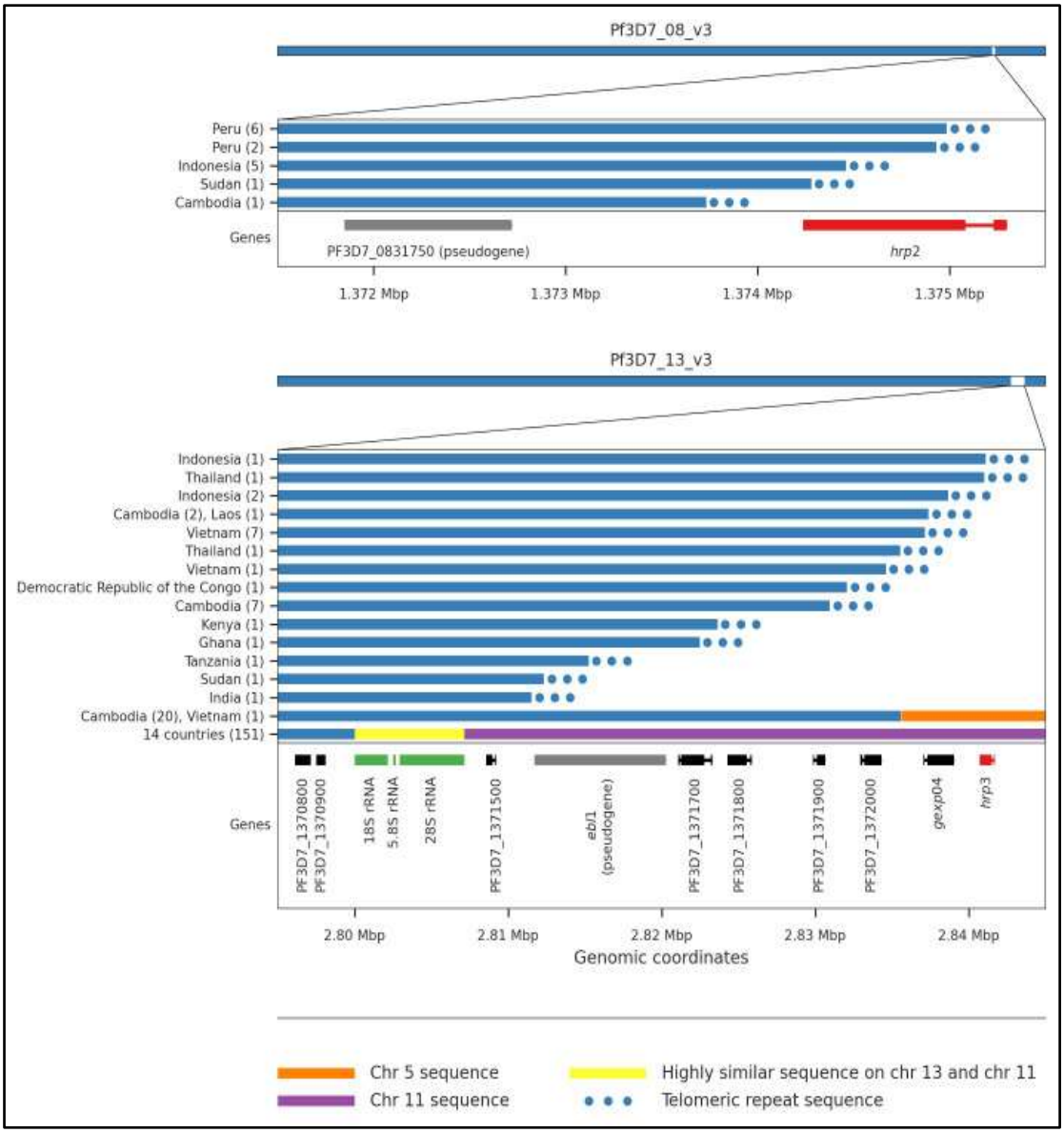


Figura 3. Puntos de corte en las diferentes regiones de los genes *pfhrp2*/*3* (Imagen tomada de MalariaGEN, 2023).

II.6. Deleciones en los genes *pfhrp2/3* en Sudamérica.

El estudio de las deleciones en los genes *pfhrp2/3* en Sudamérica ha cobrado gran relevancia debido al impacto que estas mutaciones tienen sobre la efectividad de las PDRs, ampliamente utilizadas en zonas remotas de la Amazonía. La detección de parásitos con deleciones en estos genes permite alertar a los sistemas de salud para reconsiderar el uso de PDRs basadas en HRP2 e implementar métodos alternativos.

En Brasil, Houzé et al. (2011) reportaron el primer caso de una doble deleción en los genes *pfhrp2/3*, luego de observar un resultado negativo en una PDR en un paciente con malaria confirmada por *P. falciparum*. Posteriormente, Rachid Viana et al. (2017) analizaron muestras de los estados de Acre, Rondonia y Pará, encontrando deleciones en *pfhrp2* en 27 muestras (32.9%) y en *pfhrp3* en 78 muestras (39%). El estado de Pará fue el único en el que no se detectaron deleciones en *pfhrp2*. En un estudio posterior, Goes et al. (2020) reportaron prevalencias aún mayores: en Acre, 94.9% de las muestras presentaron deleción en *pfhrp3* y 71.7% en *pfhrp2*; mientras que en Amazonas el 100% de las muestras (n = 60) tuvo deleción en *pfhrp2* y el 98.3% en *pfhrp3*. Los autores recomendaron reconsiderar el uso de PDRs en estas regiones por la alta frecuencia de deleciones.

En Colombia, Pava et al. (2010) fueron los primeros en sospechar la existencia de estas deleciones tras obtener resultados indeterminados con PDRs en pacientes con malaria. Posteriormente, Murillo-Solano et al. (2015) identificaron 80 muestras con deleción en *pfhrp3* (70%) en las regiones de Córdoba, Nariño, Valle del Cauca, Guaviare y Meta. Al año siguiente, Dorado et al. (2016) reportaron una prevalencia de 45.5% (n = 112) de deleción en *pfhrp3* en Antioquía, Chocó, Cauca y Nariño. En este país la deleción más frecuente corresponde al gen *pfhrp3*.

En Ecuador y Bolivia, los reportes han sido más limitados. Sáenz et al. (2015) identificaron un caso (3%) de deleción en *pfhrp2* durante un brote atribuido a la

posible expansión clonal de *P. falciparum* en la región de Esmeraldas (Ecuador). En Bolivia, Rachid Viana et al. (2017) reportaron la deleción del gen *pfhrp3* en 17 muestras (68%), sin detección significativa de deleciones en *pfhrp2*.

Finalmente, en el Perú se registró el primer reporte mundial de deleciones en los genes *pfhrp2/3* en muestras de campo de la Amazonía. Entre 1998 y 2010, Gamboa et al. (2010), Akinyi et al. (2013), Baldeviano et al. (2015), Bendezú et al. (2022) y Kattenberg et al. (2023) reportaron una prevalencia elevada de deleción en *pfhrp3*. Posteriormente, se identificaron incrementos notables en la deleción del gen *pfhrp2* y en las dobles deleciones, reportadas por Maltha et al. (2012), Quispe (2017), Bendezú et al. (2022), Valdivia et al. (2022), Figueroa-Ildefonso (2023) y Cabrera-Sosa et al. (2024). Aunque la deleción de *pfhrp2* aumentó con el tiempo, la deleción de *pfhrp3* se mantuvo prevalente en la región. La Tabla 2 muestra un resumen de los estudios que caracterizaron la deleción en los genes *pfhrp2/3* y sus regiones flanqueantes.

Tabla 2. Frecuencia de las deleciones en los genes *pfhrp2*, *pfhrp3* y sus regiones flanqueantes en muestras de *P. falciparum* colectadas en el Perú por orden cronológico (Adaptado de Cabrera 2024). **N**: Número de muestras colectadas, **0831900** y **0831700**: regiones flanqueantes al gen *pfhrp2* (PF3D7_0831900 y PF3D7_0831700, respectivamente), **1372100** y **1372400:** regiones flanqueantes al gen *pfhrp3* (PF3D7_1372100 y PF3D7_1372400, respectivamente), -: No analizado

Año de colecta	Región	Área de estudio	N	Regiones génicas (%)			Regiones flanqueantes (%)				Referencia
				pfhrp2	*pfhrp3*	*pfhrp2/pfhrp3*	0831900	0831700	1372100	1372400	
1998 - 2000	Loreto	Padre Cocha	36	13.0	-	-	38.9	6.5	-	-	Akinyi et al. (2013)
		Caballo Cocha	46	36.1	-	-	61.1	27.8	-	-	
1999 - 2000	Tumbes	Tumbes	82	76.8	-	-	-	-	-	-	Baldeviano et al. (2015)
2001	Piura	Bellavista	10	0	-	-	0	0	-	-	Akinyi et al. (2013)
2003 - 2005	Loreto	Iquitos	96	40.6	-	-	44.8	11.4	-	-	
		Loreto	151	43.0	61.6	24.8	-	-	-	-	Kattenberg et al. (2023)
2003 - 2007	Loreto	Iquitos	117	36.0	69.0	18.4	-	-	-	-	Gamboa et al. (2010)
2004	Loreto	Yurimaguas	15	50.0	83.0	33.3	-	-	-	-	
2005	Cajamarca	Jaén	2	100	0	0	-	-	-	-	
2006 - 2008	Amazonas	Condorcanqui	8	80.0	20.0	20.0	-	-	-	-	
2007	Loreto	San Lorenzo	17	13.0	87.0	40.0	-	-	-	-	
2009 - 2010	Loreto	San Juan	32	28.1	56.2	28.1	53.1	3.2	28.1	50.0	Bendezú et al. (2022)
		Yurimaguas	12	16.6	33.3	8.3	100	16.6	16.6	8.3	
		Mazán	11	27.2	63.3	18.1	100	45.4	27.2	18.1	
		Atalaya	19	0	15.7	0	84.2	10.5	5.2	5.2	
		Requena	11	100	100	100	81.8	9.0	0	100	
		Urarinas	5	60.0	80	60.0	100	80.0	60.0	80.0	
		Datem del Marañón	2	100	100	100	100	100	0	0	
		Caballo cocha	1	100	100	100	100	0	0	100	

2010 - 2011	Loreto	Iquitos	74	25.7	45.9	25.7	-	-	-	-	Maltha et al. (2012)
2011 - 2018	Loreto	Iquitos	324	77.2	71.6	67.0	-	-	-	-	Valdivia et al. (2022)
2012 - 2014	Loreto	Cahuide	76	62.0	45.0	38.0	50.2	16.7	33.5	12.8	Quispe (2017)
		San José de Lupuna	58	53.4	62.1	36.0	37.0				
2013	Loreto	Santa Emilia	93	47.3	43.0	37.0	28.4	64.1	4.5	28.4	
2013 - 2016	Loreto	Loreto	67	3.0	38.8	28.4	64.1	4.5	28.4	9.0	Figueroa-Ildefonso (2023)
2013 - 2017	Loreto	Maynas	103	0	1.0	84.5	80.6	1.0	81.6	2.9	
2013	Loreto	Datem del Marañón	1	0	0	0	0	0	0	0	
2016	Loreto	Ramón Castilla	1	0	0	0	0	0	0	0	
		Santa Emilia	12	16.7	0	0	-	-	-	-	Cabrera-Sosa et al. (2024)
2018	Loreto	Mazán	9	100	100	100	-	-	-	-	
		Andoas	4	25.0	50.0	25.0	-	-	-	-	
2019	Loreto	Nueva Jerusalén	14	50.0	57.1	64.3	-	-	-	-	
2020	Loreto	Nueva Jerusalén	44	50.0	18.2	64.3	-	-	-	-	

II.7. Técnicas moleculares para la detección de deleciones *pfhrp2/3.*

La detección de parásitos con deleciones en los genes *pfhrp2/3* es importante para complementar el diagnóstico de la malaria. Ante la posibilidad de obtener falsos negativos mediante PDRs, la OMS ha sugerido una técnica de PCR anidada para caracterizar estas deleciones (WHO, 2024c, Akinyi et al. 2013, Abdallah et al. 2015). Esta metodología permite identificar tanto deleciones totales como parciales y se compone de dos reacciones: la primera amplifica el exón 2 por PCR convencional y la segunda amplifica el exón 1, el intrón y parte del exón 2 por PCR anidada. La Figura 4 muestra la posición de los *primers*. Años previos a esa metodología, Baker et al. (2005) y Gamboa et al. (2010) realizaron la detección enfocándose únicamente en el exón 2, a diferencia del protocolo de la OMS.

Para estos procedimientos, la OMS recomienda utilizar tres cepas control: 3d7, Dd2 y HB3. La cepa 3d7 actúa como control positivo, ya que en su genoma conserva ambos genes (*pfhrp2*/*3*). En contraste, Dd2 presenta deleción en *pfhrp2,* pero no en *pfhrp3* (control positivo para *pfhrp3*), mientras que HB3 muestra el patrón inverso (control positivo para *pfhrp2*) (Cheng et al. 2014).

Posteriormente, Schindler et al. (2019), Grignard et al. (2020) y Beshir et al. (2022) implementaron una PCR multiplex en tiempo real para amplificar simultáneamente los genes *pfhrp2/3* junto con genes constitutivos. Esta técnica permite cuantificar la parasitemia antes de la detección de deleciones, reduciendo el riesgo de falsos negativos en muestras con baja carga parasitaria. Sin embargo, su principal limitación es que amplifica solo una sección de cada gen, lo que impide detectar deleciones parciales.

Por otro lado, Vera-Arias et al. (2021) aplicaron PCR digital de gotas (ddPCR), capaz de detectar deleciones del gen *pfhrp2/3* mediante la partición de cada muestra en microgotas. Este enfoque ofrece una sensibilidad superior a la PCR en tiempo real; no

obstante, estudios previos (Kosir et al. 2017 y Emslie et al. 2019) han señalado limitaciones asociadas al volumen de gotas inoculadas. Además, estos ensayos requieren validación mediante PCR convencional o en tiempo real. En la Tabla 3 se presentan las principales ventajas y desventajas de cada metodología. Históricamente, la mayoría de los protocolos de genotipificación se han centrado en el exón 2 de ambos (Baker et al. 2005; Cheng et al. 2014). Sin embargo, Costa et al. (2021) compararon protocolos dirigidos a todo el gen frente a aquellos enfocados únicamente en el exón 2, observando resultados contrastantes. Asimismo, estudios genómicos recientes (MalariaGEN et al. 2023) han identificado puntos de corte dentro de estos genes que explican la existencia de deleciones parciales (aquellas en las que solo uno de los exones está presente).

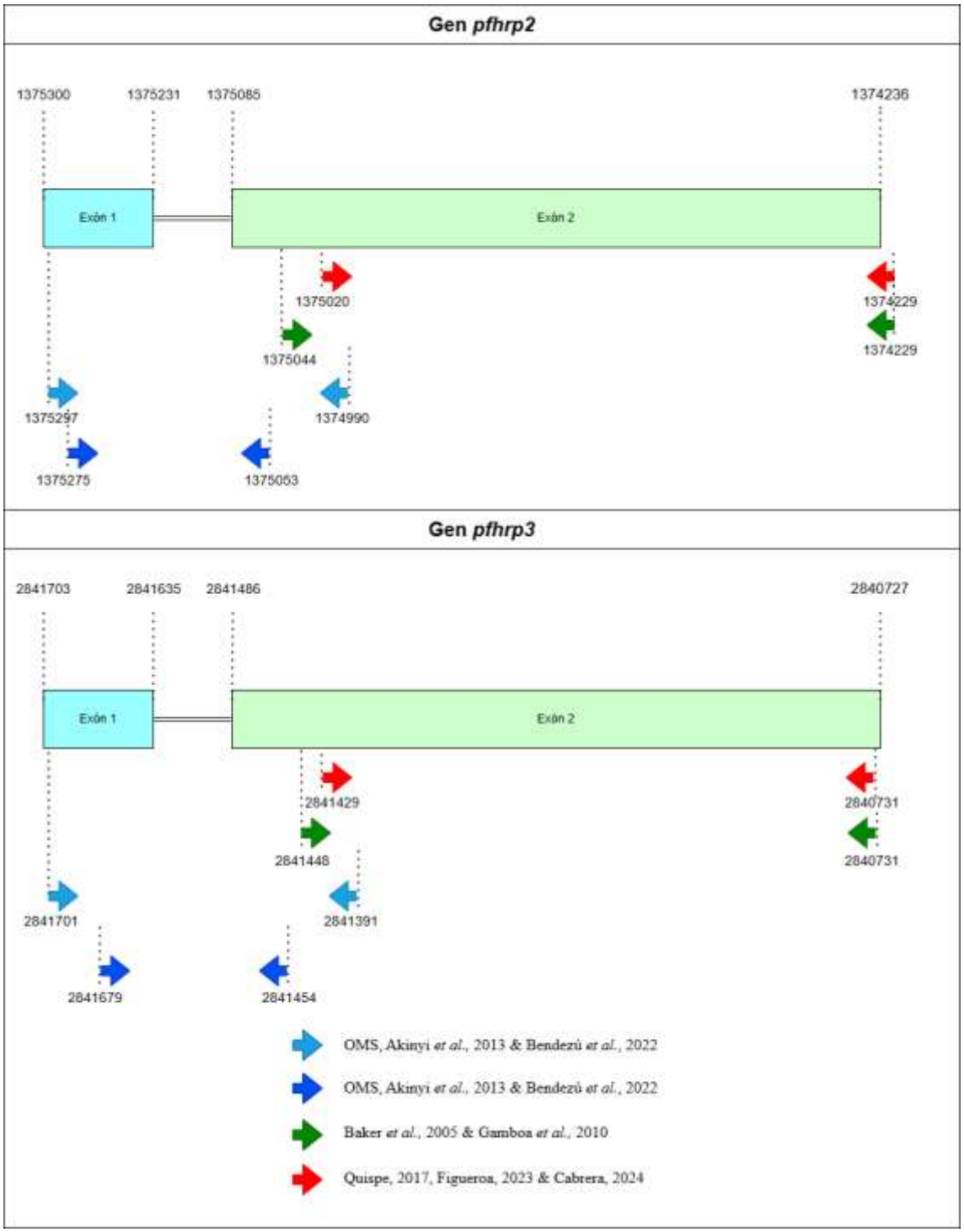


Figura 4. Ubicación de los *primers* utilizados por diferentes autores para caracterizar deleciones en los genes *pfhrp2/3*. La flecha celeste y azul hacen referencia a una PCR anidada (reacción externa e interna, respectivamente), mientras que la flecha roja y verde, a una PCR convencional.

Tabla 3: Ventajas y desventajas de las metodologías de PCR enfocadas en la amplificación de los genes *pfhrp2/3* (Adaptado de Beshir et al. 2022).

Metodología	Ventajas	Desventajas
PCR convencional	● Se puede implementar en la mayoría de los laboratorios que realizan diagnóstico molecular de malaria. ● Puede detectar deleciones parciales y totales.	● Requiere mucho tiempo por reacción. ● Requiere múltiples reacciones de PCR, incluyendo los genes controles. ● Necesidad de visualizar productos de PCR en geles de agarosa. ● Los ensayos de PCR nested son propensos a la contaminación. ● Se requiere de altos volúmenes de ADN para todas las reacciones de PCR.
PCR multiplex en tiempo real	● Genera una lectura cuantitativa. ● Puede detectar infecciones mixtas para ambos genes *pfhrp2/3*. ● Solo se necesita una reacción de PCR por lo que requiere un menor volumen de ADN.	● Se requiere un equipo de PCR con fluorescencia. ● Se requiere capacitar al personal para interpretar los resultados. ● Es complicado detectar deleciones parciales.
PCR digital en gotas	● Presenta mayor sensibilidad que las otras variantes. ● Puede detectar infecciones mixtas que involucran ambos genes presentes o ausentes.	● El equipo no está ampliamente disponible. ● Requiere experiencia avanzada en análisis y laboratorio. ● Tipo de PCR más caro respecto al resto.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

III.1. Hipótesis

La frecuencia de las dobles deleciones en los genes *pfhrp2*/*3* de *P. falciparum* es porcentualmente menor en el distrito de Río Santiago (Amazonas) en comparación con los otros dos distritos remotos de la región Loreto, debido a la limitada conectividad entre las poblaciones de estas zonas.

III.2. Objetivos

Objetivo general

Comparar los perfiles de deleción en los genes *pfhrp2/3* de *P. falciparum* entre el distrito de Río Santiago (Amazonas) y otros dos distritos remotos de Loreto, mediante la aplicación de un protocolo de genotipificación dirigido hacia su exón 1.

Objetivos específicos

1. Obtener un protocolo de genotipificación de *P. falciparum* para la detección de deleciones en el exón 1 de los genes *pfhrp2/3* en muestras de la Amazonía peruana.

2. Caracterizar los perfiles de los genes *pfhrp2/3* de *P. falciparum* en muestras provenientes del distrito de Rio Santiago (Amazonas) y otros dos distritos remotos de la región Loreto.

3. Evaluar la concordancia entre los protocolos de PCR dirigidos al exón 1 y al exón 2 en los genes *pfhrp2/3* para la detección de deleciones en muestras de *P. falciparum*.

III.3. Variables

Variable independiente:

- Procedencia geográfica de las muestras: distritos de Río Santiago (región de Amazonas), Andoas y Trompeteros (región de Loreto).

Variables dependientes:

- Presencia o ausencia de los exones 1 y 2 en los genes *pfhrp2/3* y sus regiones flanqueantes.
- Perfil de la deleción completa (exones 1 y 2) o parcial en los genes *pfhrp2/3*.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Área de estudio

Las muestras biológicas fueron recolectadas de las regiones de Amazonas y Loreto entre los años 2019 y 2023.

En la región de Amazonas, específicamente en el distrito de Río Santiago, se obtuvieron 50 muestras de individuos infectados con *P. falciparum,* distribuidas en once comunidades: Ayambis, Chapiza, Nauta, Alianza Progreso, Nazareth, Soledad, Pachis, Cucuasa, Pampa Entsa, Nueva Esperanza e Isla Grande. Estas comunidades son habitadas principalmente por pobladores indígenas Awajún y Wampis (1library, 2022). El acceso a esta zona es principalmente fluvial a través del río Santiago, afluente del río Marañón, cuyo curso atraviesa todo el distrito. El desplazamiento hacia estas comunidades desde Chachapoyas (capital de Amazonas) requiere viajar por vía terrestre hasta Santa María de Nieva (capital de Condorcanqui) y posteriormente continuar por transporte fluvial, un trayecto que puede tomar desde varias horas hasta días. Solo las comunidades de Soledad y Nazareth cuentan con pequeñas pistas de aterrizaje utilizadas ocasionalmente para emergencias médicas.

En la región Loreto, se recolectaron 92 muestras en los distritos de Andoas y Trompeteros. En el distrito de Andoas (provincia del Datem del Marañón), las muestras provinieron de las comunidades de Washientza, Limoncocha, Puerto Pijuayal, Huagramona y Nuevo Andoas, habitadas principalmente por pobladores indígenas Achuar, Kandozi y Kichwa (PJP, 2024). El acceso a esta zona es igualmente complejo y limitado. Desde Iquitos, la ruta más rápida consiste en tomar una avioneta hasta la ciudad de San Lorenzo, para luego continuar por vía fluvial a través del río Marañón hasta su afluente, el río Pastaza. Desde allí, el ingreso a Huagramona y Nuevo Andoas se realiza directamente por el Pastaza, mientras que a Washientza se accede por el río Huasaga, en un recorrido de aproximadamente 12 horas desde San Lorenzo. Esta

última comunidad es la única que cuenta con helipuerto para emergencias. Por otro lado, Limoncocha y Puerto Pijuayal se alcanzan navegando por el río Huitoyacu. Durante la estación seca o “época decreciente”, la reducción de lluvias disminuye el caudal de los ríos Huasaga y Huitoyacu, lo cual dificulta considerablemente el transporte fluvial. Además, estas comunidades enfrentan importantes desafíos, como el aislamiento geográfico, la limitada presencia estatal y la escasez de servicios básicos (PJP 2024).

Finalmente, en el distrito de Trompeteros (provincia de Loreto), se incluyó la comunidad de Nueva Jerusalén, habitada por pobladores indígenas Achuar (Cabrera-Sosa, 2024). El acceso desde Iquitos puede realizarse por vía fluvial, entre 2 y 3 días, o por vía aérea (1 h) hasta San Lorenzo, seguido de un tramo terrestre de aproximadamente 4 h por trocha (Cabrera-Sosa, 2024).

La Figura 5 muestra la ubicación geográfica de las comunidades muestreadas y la Tabla 4 presenta la cantidad de muestras seleccionadas y su año de colecta en estos tres distritos remotos y de difícil acceso. Las coordenadas de cada lugar se muestran en el Anexo 2.

Tabla 4. Coordenadas de las 17 comunidades pertenecientes a las dos regiones de estudio.

Región	Distrito	Comunidad	No de muestras	Año de colecta
Amazonas	Río Santiago (n = 50)	Ayambis	3	2019
		Chapiza	18	2020 - 2022
		Nauta	2	2020
		Alianza Progreso	14	2019 - 2022
		Soledad	1	2022
		Nazareth	6	2022 - 2023
		La Isla	1	2022
		Pachis	2	2022
		Cucuasa	1	2022
		Pampa Entsa	1	2022
		Nueva Esperanza	1	2023
Loreto	Andoas (n = 35)	Washientza	1	2023
		Limoncocha	12	2023
		Puerto Pijuayal	18	2023
		Huagramona	3	2019
		Nuevo Andoas	1	2019
	Trompeteros (n = 57)	Nueva Jerusalén	57	2019 - 2020

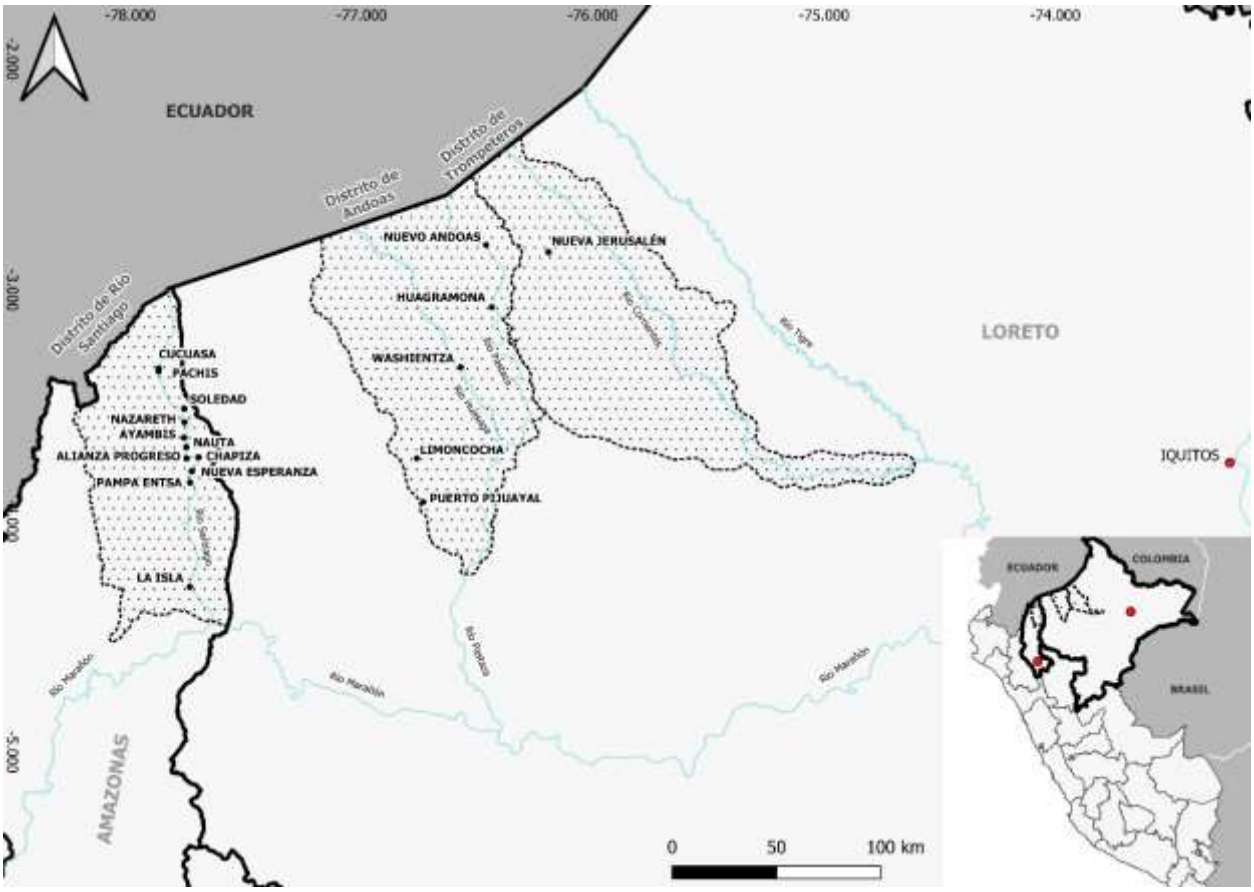


Figura 5. Ubicación de las comunidades donde se colectaron muestras positivas de *P. falciparum*, situadas en los distritos de Río Santiago (Amazonas), Andoas y Trompeteros (Loreto).

IV.2. Diseño de investigación

Esta investigación tiene un diseño cuantitativo descriptivo debido a que se está buscando caracterizar genotípicamente, describir y comparar la frecuencia de la deleción en los genes *pfhrp2*/*3* en muestras colectadas de dos diferentes regiones (Amazonas y Loreto). Luego, se registraron los datos con el fin de realizar comparaciones mediante análisis estadístico. Además, este estudio es transversal debido a que se analizó a la población un único momento en el tiempo, el cual abarcó entre los años 2019 a 2023.

La primera etapa consistió en estandarizar un protocolo de PCR convencional para amplificar el exón 1 de los genes *pfhrp2*/*3*. Luego, mediante secuenciación de Sanger

se validó la región amplificada por los *primers* utilizados. El ensayo de sensibilidad tuvo como objetivo certificar la cantidad mínima de parasitemia que puede expresarse como una banda en una corrida de electroforesis.

La segunda etapa consistió en seleccionar las muestras de individuos infectados con *P. falciparum* de las regiones de Loreto y Amazonas. Posteriormente, se determinó el límite de detección mediante un protocolo de PCR en tiempo real utilizando sondas Taqman con el fin de conocer la cantidad de parásitos de cada muestra utilizando diluciones de una muestra positiva con parasitemia conocida. Adicionalmente a ello, se procedió a cuantificar cada muestra y descartar aquellos que estaban fuera del límite de detección.

Ambas etapas concluyen con el proceso de genotipificación de los genes *pfhrp2*/*3* enfocados en el exón 1 y 2 junto con la amplificación de las regiones flanqueantes de cada gen (Figura 6).

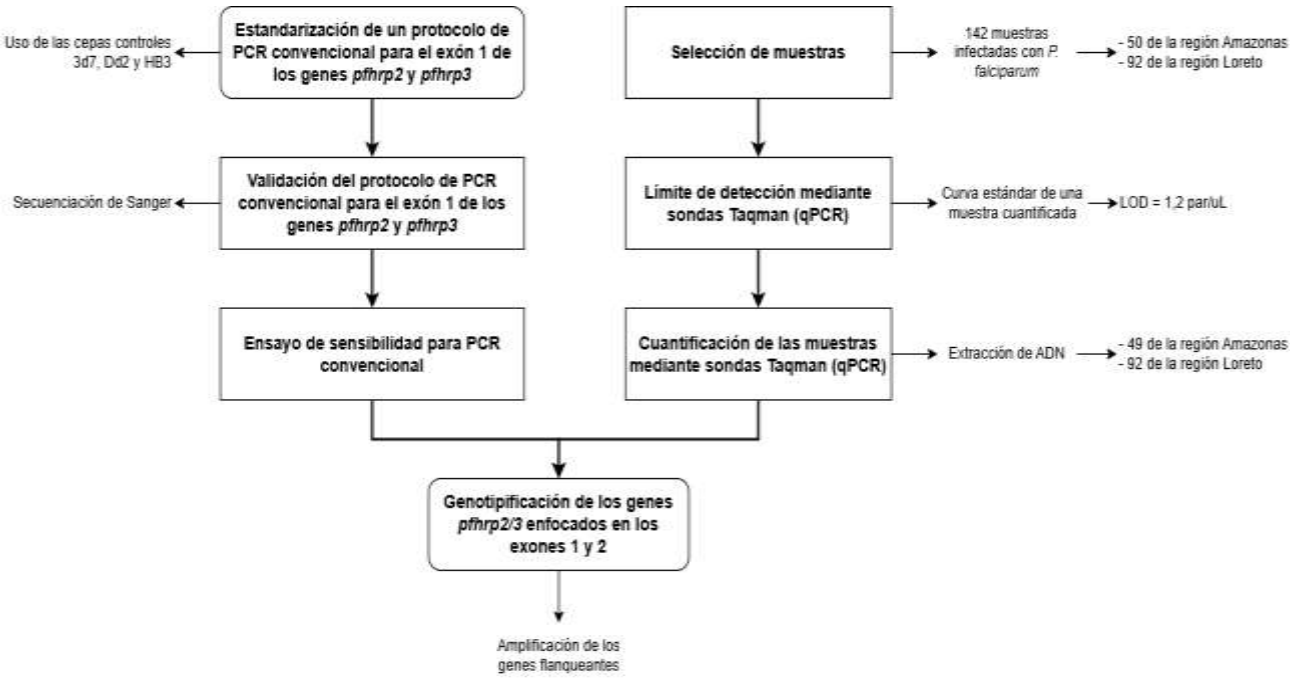


Figura 6. Flujograma de trabajo

IV.3. Obtención de muestras y aspectos éticos

Se seleccionaron muestras positivas con *P. falciparum* colectadas por el personal de tres diferentes proyectos, con sus respectivas aprobaciones éticas. Entre ellos, el método de colecta fue por sangre capilar mediante gota gruesa en papel filtro y en *microtainers*. Algunas muestras ya tenían el ADN extraído.

Este estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) de la UPCH, con código SIDISI: 214705 (Anexo 1).

Las muestras utilizadas fueron de distintos proyectos aprobados por sus respectivos CIEI. En primer lugar, las muestras provenientes de la región Amazonas, distrito de Río Santiago, fueron colectadas en el marco del proyecto "Vigilancia genómica de *Plasmodium* y su impacto en el control de la malaria en comunidades nativas de la región Condorcanqui, Amazonas – MALARIA", desarrollado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza (UNTRM) y financiado por PROCIENCIA (Contrato N° PE501078584-2022-PROCIENCIA; código 0015). Por otro lado, las muestras correspondientes a la región Loreto, distrito de Andoas, fueron obtenidas durante la ejecución del proyecto "Rendimiento clínico de las pruebas rápidas de diagnóstico NxTek™ Malaria P.f plus y NxTek™ Malaria P.f/P.v para la detección de infecciones por *Plasmodium* en pacientes con síntomas indicativos de malaria para la precalificación por la OMS", liderado por la UPCH y financiado por las instituciones FIND y ABBOTT (código SIDISI: 206501). Finalmente, las muestras del distrito de Trompeteros (Loreto) provinieron del proyecto "Esfuerzos conjuntos para la eliminación de la malaria en la Amazonía peruana", también desarrollado por la UPCH y financiado por VLIR-UOS (código SIDISI: 102725).

IV.3.1. Muestra hemática en papel filtro

Un total de 41 muestras hemáticas se obtuvieron a partir de sangre capilar para preparar una gota gruesa y depositar una alícuota en el papel filtro. Estas se conservaron a temperatura ambiente hasta su traslado al laboratorio para su posterior análisis (Pardavé-Lugo et al. 1997).

IV.3.2. Muestra hemática en *microtainers*

Este tipo de extracción fue similar al procedimiento anterior, con la diferencia de que se recopiló una cantidad adecuada de gotas en un *microtainer* (~300–500 µL), que se conservó a -20°C hasta su traslado al laboratorio. En el laboratorio, las muestras fueron centrifugadas y se recuperó únicamente la fracción de glóbulos rojos (paquete globular) para su posterior conservación y análisis. En total, se trabajó con 31 muestras de este tipo.

IV.3.3. Muestras de ADN

Se seleccionaron 79 muestras de ADN proporcionadas por la UPCH, las cuales se mantuvieron conservadas a -20°C desde su extracción, por el proyecto respectivo. La extracción se realizó mediante columnas de sílice; y el procedimiento detallado se presenta en la sección IV.4.

IV.4. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de muestras de sangre impregnadas en papel filtro y de paquete globular conservado a -20°C. Se empleó el protocolo de extracción de ADN del Laboratorio de Malaria de la UPCH, adaptado del manual del kit E.Z.N.A.® Blood DNA Mini Kit (Omega Bio-tek). Para ambos tipos de muestra: papel filtro y paquete globular, se utilizó el mismo protocolo.

El protocolo adaptado incluyó 40 µL de paquete globular o un área de 72 mm² de papel filtro con sangre impregnada. Luego de esterilizar los materiales de trabajo mediante luz ultravioleta, se añadió la cantidad correspondiente de muestra (paquete globular o papel filtro). Posteriormente, se agregaron 250 µL de buffer de lisis TEN 2X (Tris-HCl 1 M pH 8.0, NaCl 5 M, EDTA 0.5 M pH 8.0), 180 µL de agua destilada y 50 µL de SDS al 10%. La mezcla se agitó en vortex e incubó a 65°C durante 1 h con agitación constante a 300 rpm. Tras la incubación, se adicionaron 25 µL de proteinasa K y se volvió a incubar bajo las mismas condiciones (65°C, 300 rpm) durante 30 min. Luego, se agregaron 250 µL de buffer BL y 250 µL de etanol absoluto, se agitó nuevamente en vortex y la solución resultante se transfirió a una mini columna de sílice, centrifugándose a 8000 rpm por 1 min. A continuación, se descartó el tubo colector y se colocó uno nuevo. Se añadió 500 µL de buffer HBC y se centrifugó a 8000 rpm por 1 min. El lavado se realizó dos veces con 700 µL de Wash Buffer, centrifugando cada vez a 8000 rpm por 1 min. Posteriormente, la columna se centrifugó a 12000 rpm por 2 min para su secado.

Finalmente, para la elución del ADN, se adicionaron 50 µL de Elution Buffer (previamente calentado a 65°C), se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 min y se centrifugó a 12000 rpm por 1 min. El ADN obtenido se almacenó a -20°C hasta su uso.

IV.5. Estandarización de la amplificación del exón 1 de los genes *pfhrp2/3* mediante PCR convencional.

La región del exón 1 del gen *pfhrp2* que se buscó amplificar tiene un tamaño de 308 pb, mientras que la del gen *pfhrp3* presenta 311 pb. Los *primers* utilizados (Tabla 5) fueron seleccionados a partir de una revisión bibliográfica y corresponden al protocolo de reacción externa de una PCR anidada (Cheng et al. (2014), el cual también es sugerido por la OMS (WHO, 2024c). Se optó por utilizar los *primers* de la reacción externa debido a su especificidad bioinformática con los genes *pfhrp2/3*, así como para reducir costos y el número de etapas experimentales respecto a la caracterización completa de ambos genes.

Tabla 5. *Primers* utilizados para la amplificación del exón 1 en los genes *pfhrp2/3.*

Gen	Primer	Secuencia (5´- 3´)
pfhrp2	Forward	GGTTTCCTTCTCAAAAAATAAAG
	Reverse	TCTACATGTGCTTGAGTTTCG
pfhrp3	Forward	GGTTTCCTTCTCAAAAAATAAAA
	Reverse	CCTGCATGTGCTTGACTTTA

Las reacciones de amplificación se realizaron utilizando el kit AccuStart II Taq DNA Polymerase (QuantaBio). Esta enzima posee un anticuerpo monoclonal que la mantiene inactiva hasta la fase inicial de desnaturalización. Además, no presenta actividad exonucleasa 3', por lo que está libre de cualquier actividad exonucleasa contaminante y carece de capacidad de *proofreading* (corrección de errores). Se optimizó la especificidad y el rendimiento de las amplificaciones evaluando gradientes de temperatura de *annealing* del ciclo de PCR (55–65°C) y diferentes concentraciones de cebadores (0.1 - 0.5 µM). Para la estandarización se emplearon como muestras de ensayo los controles 3D7, HB3 y Dd2.

Para corroborar que la región amplificada correspondiera a la esperada, se secuenciaron ambas hebras de los productos con sus tamaños adecuados. Los

amplicones fueron previamente purificados mediante el kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), siguiendo las indicaciones del fabricante. La secuenciación de las hebras *forward* y *reverse* se realizó utilizando los mismos cebadores empleados en la PCR convencional. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo con el kit BigDye® Terminator v3.1 Sequencing Kit (Thermo Scientific), considerando una mezcla final de 20 µL que contenía: Premix Ready Reaction 2.5X, Buffer BigDye Sequencing 5X, *primers forward* y *reverse* a 3.2 µM, y ADN molde a 20 ng/µL. Las reacciones se realizaron en microtubos de 0.2 µL, en un termociclador Mastercycler (Eppendorf), bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 96°C por 10 s, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 96°C por 10 s, *annealing* a 50°C por 5 s y extensión a 60°C por 4 min. Posteriormente, las muestras fueron secuenciadas en un analizador genético ABI 3500 (Applied Biosystems). Los electroferogramas obtenidos de cada hebra se editaron manualmente con el software Chromas v2.6.6, y posteriormente se generó una secuencia consenso. Esta secuencia fue comparada con la correspondiente a la cepa 3D7 disponible en la base de datos GenBank (NCBI), utilizando la herramienta BLASTn. Se consideraron parámetros de identidad del 100% y cobertura del 100% para confirmar que la región amplificada correspondía a la inicialmente planteada.

IV.6. Sensibilidad para la detección de la presencia de los genes *pfhrp2/3* mediante PCR convencional.

Para establecer la cantidad mínima de parásitos por muestra detectable mediante PCR convencional para los genes *pfhrp2/3*, se utilizó la cepa control positiva 3D7, la cual presenta una concentración de 5.9 x 10^5 parásitos/µL. Se realizaron diluciones seriadas (Tabla 6) hasta alcanzar una concentración mínima de 1.48 parásitos/µL. Las muestras con una parasitemia inferior a esta dilución mínima fueron descartadas para la posterior genotipificación.

Tabla 6. Dilución seriada de la cepa 3d7 con parasitemia conocida (parásitos/µL)

Dilución	Parasitemia
10^0	590000
10^{-1}	59000
10^{-2}	5900
10^{-3}	590
10^{-4}	59
10^{-5}	5.9
$2^{-1}\ x\ 10^{-5}$	2.95
$2^{-2}\ x\ 10^{-5}$	1.48

IV.7. Límite de detección (LOD) y cuantificación mediante PCR en tiempo real

El protocolo de PCR en tiempo real, estandarizado en el Laboratorio de Malaria, está dirigido al gen *18S rRNA* y fue empleado para determinar el LOD y cuantificar las muestras. Para ello, las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 µL, compuesto por 10 µL de TaqMan™ Environmental Master Mix 2.0 (1X; Applied Biosystems), 0.2 µL de *primers* (0.1 µM), 0.16 µL de sonda TaqMan FAM (0.08 µM), 4.44 µL de agua libre de nucleasas y 5 µL de ADN molde. Los *primers* (Tabla 7) y el procedimiento corresponden a lo descrito por Rougemont et al. (2004).

Tabla 7. Secuencia de *primers* utilizados en la PCR en tiempo real con sondas Taqman para la identificación de *P. falciparum* (Rougemont et al. 2004)

Primer	**Secuencia (5´- 3´)**
Forward	GTTAAGGGAGTGAAGACGATCAGA
Reverse	AACCCAAAGACTTTGATTTCTCATAA
Sonda Taqman FAM	FAM – AGCAATCTAAAAGTCACCTCGAAAGATGACT – QSY

Para determinar el LOD de *P. falciparum* mediante PCR tiempo real, se construyó una curva de diluciones seriadas de una muestra con una concentración inicial de 4.9 x 10^5 parásitos/µL, por triplicado (Tabla 8). En los casos en que la dilución mínima amplificó solo una o dos veces del total, se realizaron 20 repeticiones adicionales con el fin de verificar que al menos el 95% de las repeticiones amplifiquen. Si este criterio no se cumplía, se procedió a recalcular el LOD.

Tabla 8. Dilución seriada de una muestra con parasitemia conocida (parásitos/µL)

Dilución	**Parasitemia**
10^0	490000
10^{-1}	49000
10^{-2}	4900
10^{-3}	490
10^{-4}	49
10^{-5}	4.9
$2^{-1}\ x\ 10^{-5}$	2.5
$2^{-2}\ x\ 10^{-5}$	1.2

La siguiente fórmula muestra la parasitemia en función del Ct de cada muestra

$$Ct\ =\ m\ x\ log_{10}(Parasitemia)\ +\ b$$

Despejando la variable “parasitemia”, se obtiene la siguiente fórmula

$$Parasitemia\ = 10^{\frac{Ct\ -\ b}{m}}$$

Donde Ct es el ciclo donde amplifica la muestra problema, “b” es el intercepto con el eje (n° de ciclos) y “m” es la pendiente de la recta (n° de ciclos/log(parasitemia)).

Las muestras con una parasitemia inferior al LOD fueron descartadas para el proceso de genotipificación.

IV.8. Genotipificación de los genes *pfhrp2/3* y sus regiones flanqueantes

IV.8.1. Genotipificación enfocada en el exón 1

Este procedimiento se realizó una vez estandarizado el protocolo para ambos exones. Se emplearon como controles las cepas 3D7, HB3 y Dd2. La cepa 3D7 presenta ambos genes (*pfhrp2*/*3*), la cepa HB3 solo presenta el gen *pfhrp2*, mientras que la cepa Dd2 únicamente posee el gen *pfhrp3*. De esta manera, para cada gen se contó con dos controles positivos y uno negativo.

IV.8.2. Genotipificación enfocada en el exón 2

Se utilizó el protocolo de PCR convencional estandarizado en el Laboratorio de Malaria, con modificaciones basadas en Akinyi et al. (2013) y siguiendo los procedimientos descritos por Figueroa-Ildefonso (2023). Se empleó el LOD determinado en este estudio (Sección IV.5.4.4) como umbral para la selección de muestras procesadas. Para la amplificación del gen *pfhrp2*, cada reacción se preparó en un volumen final que contenía: 17.3 µL de agua, 2.5 µL de Buffer 1X, 0.75 µL de $MgCl_2$ (1.5 µM), 0.25 µL de dNTPs (200 µM), 0.5 µL de *primers* (0.2 µM), 0.2 µL de enzima AccuStart Taq DNA Polimerase (1 U) y 3 µL de ADN molde. Por otro lado, en la amplificación del gen *pfhrp3*, se mantuvieron las mismas condiciones, con la única variación en el volumen y concentración de los *primers* utilizados (0.4 µL y 0.16 µM, respectivamente). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad) y la lista de los *primers* se encuentran en el Anexo 4.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 95°C durante 4 min, seguida de 35 ciclos de 95°C por 50 s, 56.3°C por 30 s y 72°C

por 1 min para *pfhrp2*. En el caso de *pfhrp3*, las condiciones fueron idénticas, excepto por la temperatura de *annealing*, que fue de 54°C. En este procedimiento también se emplearon las tres cepas control utilizadas para el exón 1.

Finalmente, la visualización de los productos amplificados se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TBE 0.5X (Tris-borato 0.045 M y EDTA 0.001 M). Cada muestra se mezcló con 2 µL de *Loading Dye* y se corrió junto a un marcador de 100 pb (Thermo Fisher). La electroforesis se efectuó a 70 V durante 1 a 2 horas, según la longitud del gel, y la visualización se realizó en un fotodocumentador Gel Doc™ XR+ System (Bio-Rad).

IV.8.3. Genotipificación de las regiones flanqueantes

Las regiones flanqueantes analizadas fueron PF3D7_081700 y PF3D7_081900 (adyacentes al gen *pfhrp2*), y PF3D7_1372100 y PF3D7_1372400 (adyacentes al gen *pfhrp3*). Para cada región flanqueante se realizó una reacción de PCR en un volumen total de 25 µL, que incluyó 2.5 µL de Buffer 1X, 0.75 µL de $MgCl_2$ (1.5 mM), 0.25 µL de dNTPs (200 µM), y 0.2 µL de AccuStar Taq DNA Polymerase (1 U). Se emplearon 3 µL de ADN molde y las concentraciones de los *primers* fueron las siguientes: 0.28 µM (0.7 µL) para PF3D7_081700, 0.2 µM (0.5 µL) para PF3D7_081900, y 0.16 µM (0.4 µL) para PF3D7_1372100 y PF3D7_1372400. El protocolo experimental fue descrito previamente por Quispe (2007) y Figueroa-Ildefonso (2023). La lista de las secuencias de los *primers* se encuentra en el Anexo 4.

IV.9. Determinación de la frecuencia de la deleción en los genes *pfhrp2/3* enfocados en el exón 1 y 2, y sus regiones flanqueantes.

Se estimó la frecuencia de cada muestra a partir de la presencia de los genes objetivo, sus exones y las regiones flanqueantes asociadas. La deleción en los exones 1 y 2 de ambos genes, así como en sus regiones flanqueantes, se consideró cuando no se observó amplificación en los protocolos correspondientes de PCR convencional. En los casos en que una muestra resultó negativa (sin amplificación), la reacción se repitió para confirmar la ausencia. Si la segunda amplificación fue positiva, se realizó una tercera reacción, y este último resultado fue el que se registró como definitivo. Por el contrario, cuando una muestra mostró amplificación en la primera PCR, dicho resultado se tomó directamente como válido.

Cabe señalar que no todas las muestras fueron evaluadas para las regiones flanqueantes, debido a la cantidad limitada de ADN disponible. Dado que cada gen presenta dos exones, la representación se estableció conforme a lo indicado en la Tabla 9. Finalmente, para la estimación de la frecuencia, se calculó el intervalo de confianza (IC) al 95% con el fin de evaluar la asociación entre las variables.

Tabla 9. Caracterización de los perfiles genotípicos de los genes *pfhrp2*/*3* según la amplificación de sus dos exones.

Exón 1	Exón 2	Perfiles de caracterización
+	+	Presencia
+	-	Deleción parcial
-	+	Deleción parcial
-	-	Deleción total
“+” indica presencia del exón y “-” indica ausencia del exón		

IV.10. Variación de perfiles en los genes *pfhrp2/3* por distrito

Para evaluar la variación de los perfiles genotípicos (presencia, deleción parcial y deleción total) entre las comunidades, se estimó la frecuencia de cada perfil por distrito. Con el fin de determinar si estas variaciones eran significativamente diferentes entre los distritos estudiados, se aplicaron pruebas de comparación de proporciones. En los casos donde las frecuencias esperadas en cada celda comparativa fueron mayores a cinco, se utilizó la prueba de Chi-cuadrado de independencia. Por el contrario, cuando las frecuencias esperadas fueron menores a cinco, se aplicó la prueba exacta de Fisher, la cual es más adecuada para tamaños muestrales pequeños o distribuciones desbalanceadas (Agresti et al. 2018). Ambas pruebas permitieron evaluar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas en la distribución de los perfiles *pfhrp2/3* entre los distritos analizados, frente a la hipótesis alternativa de que sí existen diferencias. Cuando el valor de p (*p-value*) fue menor a 0.05, se rechazó la hipótesis nula. En dichos casos, se aplicó una corrección de Bonferroni para identificar específicamente entre qué distritos se observaban las diferencias significativas. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el software RStudio (versión 3.6.0).

IV.11. Variación entre los protocolos de PCR convencional que detectan el exón 1 y el exón 2 de los genes *pfhrp2/3*.

Para comparar los perfiles genotípicos obtenidos a partir de la evaluación de los exones 1 y 2, se consideraron en conjunto todos los resultados, independientemente del distrito de procedencia. A partir de estos datos, se construyeron tablas de doble entrada siguiendo la nomenclatura indicada en la Tabla 10. Posteriormente, se compararon las deleciones identificadas mediante ambos protocolos (exón 1 y exón 2) con el propósito de evaluar la concordancia entre los resultados obtenidos.

La concordancia entre ambas metodologías se analizó mediante la índice kappa (κ), el cual permite medir el grado de acuerdo más allá del azar entre dos métodos categóricos. Los valores de κ se interpretaron según los criterios propuestos por Landis y Koch (1977), donde κ < 0 indica ausencia de concordancia, 0 – 0.20 concordancia leve, 0.21 – 0.40 moderado, 0.41 - 0.60 sustancial, 0.61 - 0.80 alto y > 0.81 casi perfecta concordancia. El análisis se realizó en el software RStudio (versión 3.6.0) utilizando la función *kappa2()* del paquete *irr*, que calcula el coeficiente de concordancia para datos categóricos de dos observadores o, como en este estudio, metodologías.

Tabla 10. Criterio de caracterización de las deleciones según la amplificación de los exones en *pfhrp2/3*

Exón 1	Exón 2	Caracterización
+	+	Deleción -
+	-	Deleción +
-	+	Deleción +
-	-	Deleción +

V. RESULTADOS

V.1. Estandarización del protocolo de detección del exón 1 para los genes *pfhrp2/3* mediante PCR convencional.

V.1.1. Gen *pfhrp2*

El protocolo estandarizado se optimizó inicialmente utilizando alícuotas de los controles positivos 3D7 y HB3. Posteriormente, se aplicó a un conjunto de muestras representativas, las cuales fueron amplificadas mediante PCR y analizadas por electroforesis en gel (Figura 7), con el objetivo de verificar la correcta amplificación y confirmar la eficiencia del protocolo.

El protocolo estandarizado finalmente, consiste en una reacción de volumen total de 25 µL, con concentraciones finales de 1X de Buffer, 1.5 mM de $MgCl_2$, 200 µM de dNTPs, 0.2 µM de cada *primer pfhrp2* y 1U de AccuStart Taq DNA Polimerase, utilizando 3 µL de ADN molde por reacción. El programa de amplificación inició con 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 s, 63.6°C por 30 s, 72°C por 30 s y 72°C por 10 min. El ADN incluido en cada pocillo fue de 3 µL.

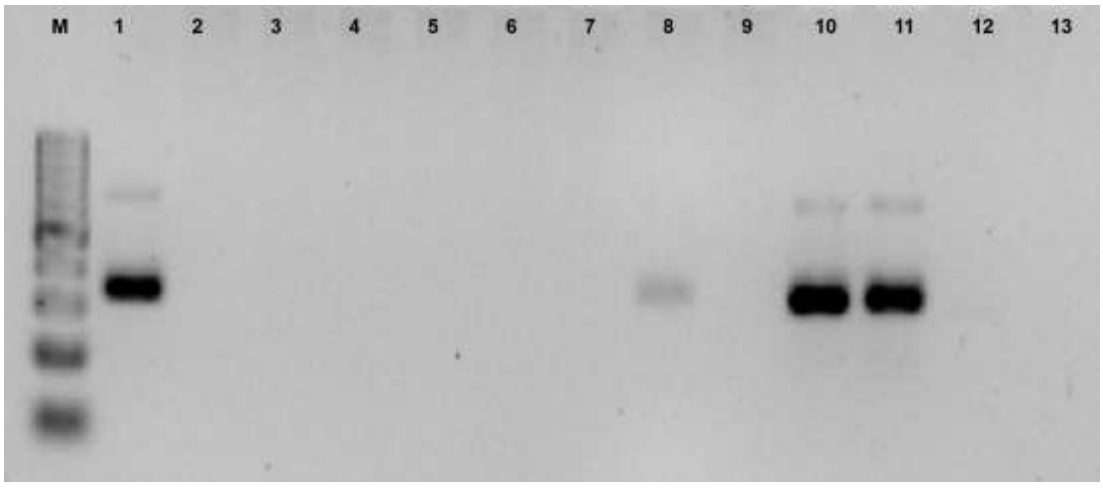


Figura 7. Amplificación del exón 1 en el gen *pfhrp2* utilizando el protocolo estandarizado en este estudio. **M**: marcador de 100 pb, **1 - 9**: Muestras pertenecientes al distrito de Andoas, **10**: cepa 3d7, **11**: cepa HB3, **12**: cepa Dd2, **13**: blanco de reacción. El tamaño esperado del amplicón es de 308 pb.

Se observó una banda definida del tamaño esperado en ambos controles positivos (3D7 y HB3), mientras que el control negativo (Dd2) no presentó amplificación. La presencia de una banda inespecífica de menor intensidad no interfirió con la identificación de la banda específica.

V.1.2. Gen *pfhrp3*

El protocolo estandarizado para el gen *pfhrp3* se optimizó inicialmente empleando alícuotas de los controles positivos 3D7 y Dd2. Posteriormente, se aplicó a un conjunto de muestras representativas, las cuales fueron amplificadas mediante PCR y analizadas por electroforesis en gel (Figura 8), con el objetivo de verificar la correcta amplificación y evaluar la eficiencia del protocolo.

El protocolo estandarizado finalmente se estableció considerando un volumen total de 25 µL, con concentraciones finales de 1X de buffer, 1.5 mM de $MgCl_2$, 200 µM de dNTPs, 0.3 µM de cada *primer pfhrp3* y 1 U de AccuStart Taq DNA Polimerasa, utilizando 3 µL de ADN molde por reacción. El programa de amplificación inició con 94°C por 5 min, seguida de 37 ciclos de 94°C por 30 s, 55.2°C por 30 s, 72°C por 30 s y 72°C por 10 min.

Se observó una banda definida del tamaño esperado en ambos controles positivos (3D7 y Dd2), mientras que el control negativo (HB3) no presentó amplificación. Sin embargo, en las muestras clínicas se detectó la presencia de múltiples bandas inespecíficas, lo que sugiere un posible alineamiento de los *primers* a regiones no deseadas del genoma humano. Este hallazgo es coherente con la coexistencia de ADN humano y *P. falciparum* en las muestras analizadas.

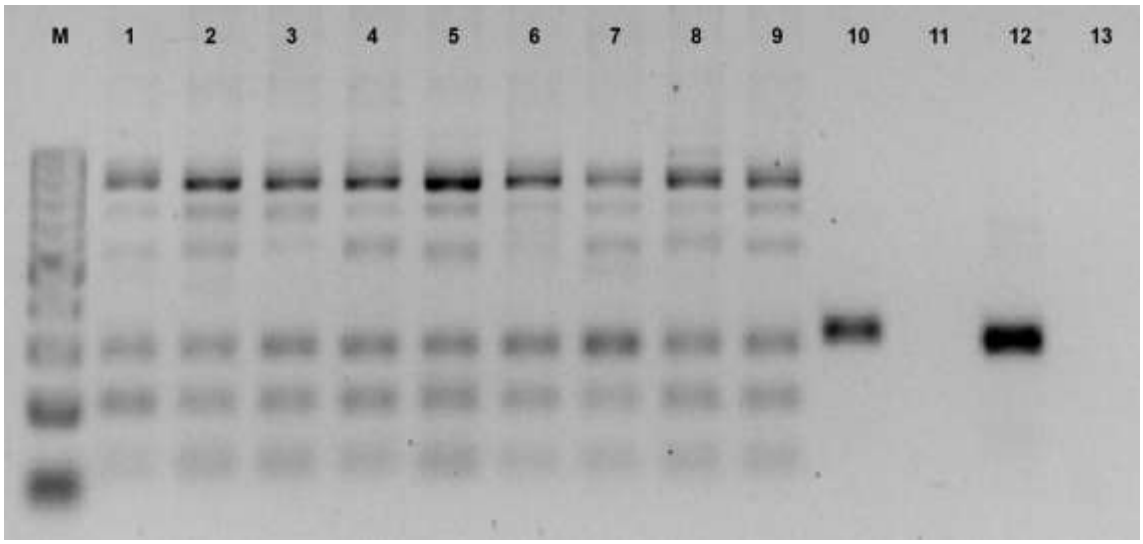


Figura 8. Amplificación del exón 1 en el gen *pfhrp3* utilizando el protocolo estandarizado en este estudio, **1 - 9**: Muestras pertenecientes al distrito de Andoas, **10**: cepa 3d7, **11**: cepa HB3, **12**: cepa Dd2, **13**: blanco de reacción. El tamaño esperado del amplicón es de 311 pb.

V.2. Especificidad de hibridación de los *primers* en el exón 1 de los genes *pfhrp2/3.*

A partir de la secuenciación del amplificado correspondiente al exón 1 del gen *pfhrp2*, se obtuvo una secuencia consenso de 310 pb. La comparación de esta secuencia con la base de datos GenBank mediante la herramienta BLASTn confirmó la especificidad del fragmento amplificado con respecto al *target* de sus *primers*, mostrando una identidad del 100% con la cepa de referencia *P. falciparum* 3D7.

En la Tabla 11 se muestran los principales resultados del alineamiento, en términos de identidad y probabilidad, así como el valor esperado (*E-value*) asociado a la probabilidad de que la coincidencia ocurra al azar. Este resultado respalda la especificidad de los *primers* para el exón 1 del gen *pfhrp2*.

Tabla 11. Códigos de accesión con mayor similitud a la secuencia consenso del gen *pfhrp2* (exón 1) analizada mediante BLASTn

Código de accesión	Resultado máximo	Resultado total	Cobertura (%)	*E-value*	Porcentaje de identidad (%)
CP131988	571	571	100	6e-158	100.00
CP131972	571	571	100	6e-158	100.00
CP016997	571	571	100	6e-158	100.00
AL844507	571	571	100	6e-158	100.00
LR131441	562	562	100	4e-155	99.36
CP101635	562	562	100	4e-155	99.35
LR131457	553	553	100	2e-152	98.72

Por otro lado, con la misma finalidad de evaluar la especificidad de los *primers* utilizados para el exón 1 del gen *pfhrp3*, se realizó un ensayo orientado a determinar su posible alineamiento con el genoma humano, ya que durante la estandarización se observó amplificación irregular en las muestras clínicas. Para ello, se evaluaron tres tipos de muestras: (1) una muestra humana negativa para malaria, (2) una mezcla 1:1 de ADN humano negativo con ADN de la cepa 3D7, y (3) una muestra problema previamente utilizada como control de calidad (Figura 9).

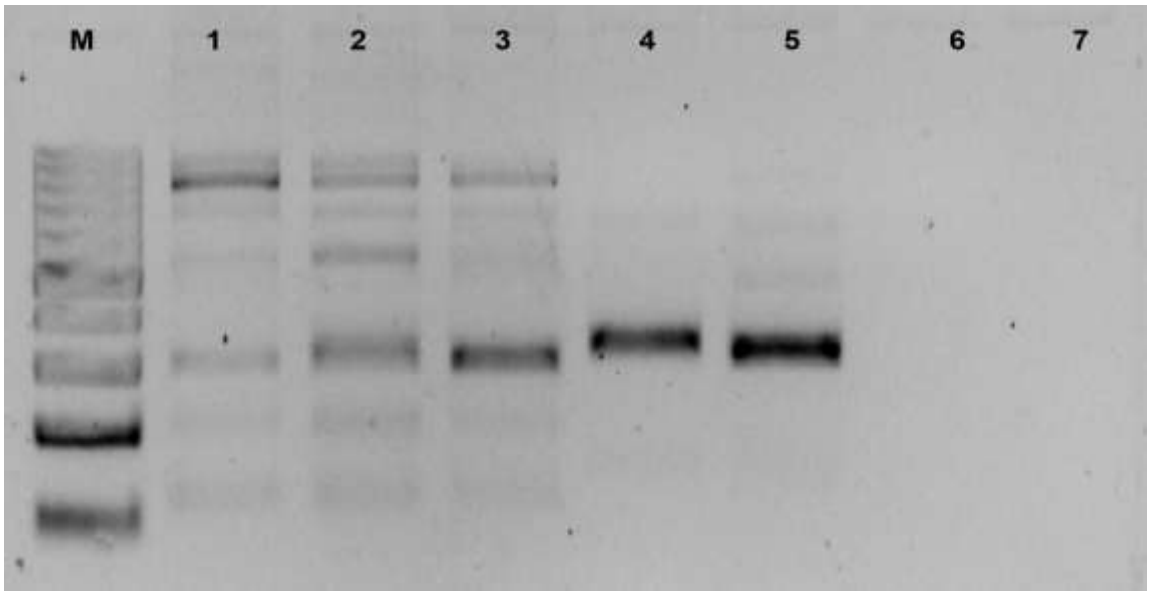


Figura 9. Ensayo de descarte de inespecificidad de los *primers* enfocados en el exón 1 del gen *pfhrp3*. **M**: marcador de 100 pb, **1**: ADN humano negativo para malaria, **2**: ADN humano negativo para malaria más la cepa 3d7 (1:1), **3**: ADN humano positivo para malaria, **4**: cepa 3d7, **5**: cepa Dd2, **6**: cepa HB3, **7**: blanco de reacción. En el carril 1 se muestra la hibridación cruzada con el genoma humano.

Se observó la presencia de bandas inespecíficas en la muestra negativa para *P. falciparum,* cuyo patrón de amplificación difirió notablemente del observado en la cepa positiva Este hallazgo sugiere una posible amplificación no específica de ADN humano.

El análisis bioinformático, realizado mediante BLASTn, confirmó esta observación: los *primers* mostraron una identidad del 100% con el gen *pfhrp3* de *P. falciparum*, pero también presentaron alineamientos significativos con secuencias del genoma humano, con valores E de 1 y 42 para los *primers forward* y *reverse*, respectivamente (Tabla 12). Estos valores indican una alta probabilidad de alineamiento al azar, lo que respalda la hipótesis de hibridación inespecífica. En conjunto, estos resultados demuestran que los *primers* utilizados para el exón 1 del gen *pfhrp3* presentan baja especificidad cuando el ADN humano está presente, explicando la amplificación no específica observada en las muestras clínicas.

Tabla 12: Primeros resultados del alineamiento de los *primers forward* y *reverse* del exón 1 del gen *pfhrp3* contra el genoma humano.

Código de accesión	**Resultado máximo**	**Resultado total**	**Cobertura (%)**	***E-value***	**Porcentaje de identidad (%)**
Secuencia *Forward*					
OZ114140	40.1	17725	91	1.0	100.00
OZ114023	40.1	10211	100	1.0	100.00
OZ114019	40.1	15904	91	1.0	100.00
OZ118533	40.1	2367	91	1.0	100.00
OZ118508	40.1	2335	91	1.0	100.00
OZ117738	40.1	1281	87	1.0	100.00
OZ117720	40.1	2329	91	1.0	100.00
Secuencia *Reverse*					
OZ118554	34.2	34.2	85	42	100.00
OZ117656	34.2	34.2	85	42	100.00
OZ114925	34.2	34.2	85	42	100.00
OZ114883	34.2	34.2	85	42	100.00
OZ114561	34.2	34.2	85	42	100.00
OZ114486	34.2	34.2	85	42	100.00
OZ109684	34.2	34.2	85	42	100.00

V.3. Sensibilidad de detección del gen *pfhrp2* (exón 1) mediante PCR convencional

Se evaluó la sensibilidad del ensayo de PCR convencional empleando diluciones seriadas de ADN de las cepas positivas *P. falciparum* 3D7 y HB3 (Figura 10). En ambas cepas se observó amplificación visible mediante electroforesis en gel, evidenciándose una mayor sensibilidad de detección en la cepa 3D7 respecto a la cepa HB3. El límite mínimo de detección se estableció en 6 parásitos/µL, correspondiente a la última dilución en la que aún se observó una banda nítida en el gel. En consecuencia, las muestras con concentraciones menores a 6 parásitos/µL fueron consideradas por debajo del umbral de detección y descartadas para los análisis de genotipificación. Este ensayo se realizó hasta tres veces demostrando su reproducibilidad (Anexo 5) y se verificó mediante la secuenciación de los fragmentos amplificados (Tabla 12).

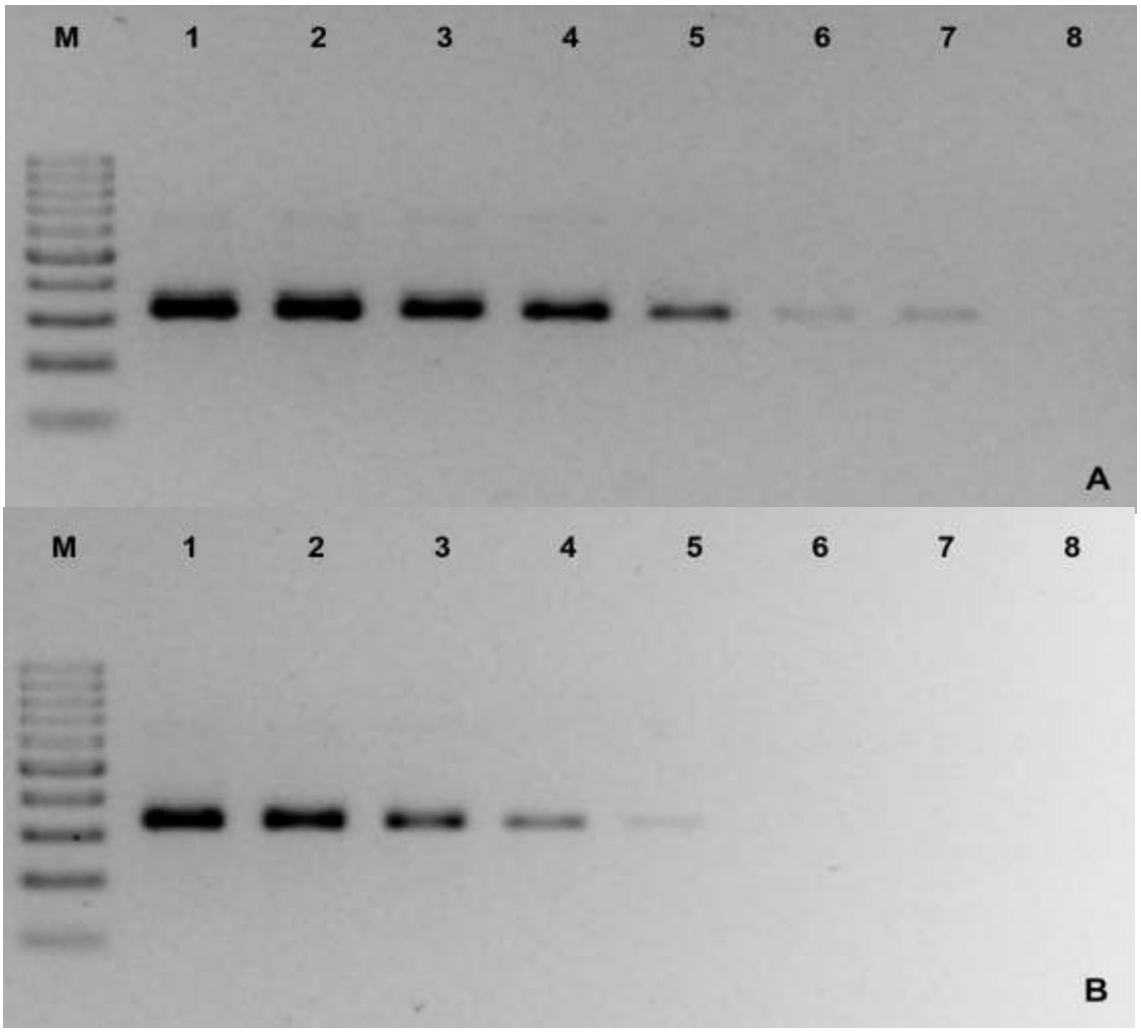


Figura 10. Diluciones para determinar la sensibilidad de la PCR: **A)** Uso de la cepa 3d7. **1**: $5.9\ x\ 10^5$, **2**: $5.9\ x\ 10^4$, **3**: $5.9\ x\ 10^3$, **4**: $5.9\ x\ 10^2$, **5**: $5.9\ x\ 10^1$, **6**: $5.9\ x\ 10^0$, **7**: $2.9\ x\ 10^0$, **8**: $1.5\ x\ 10^0$. **B)** Uso de la cepa HB3. **1**: $6.1\ x\ 10^4$, **2**: $6.1\ x\ 10^3$, **3**: $6.1\ x\ 10^2$, **4**: $6.1\ x\ 10^1$, **5**: $6.1\ x\ 10^0$, **6**: $3.1\ x\ 10^0$, **7**: $1.5\ x\ 10^0$, **8**: $0.8\ x\ 10^0$. **M**: Marcador de 100 pb.

V.4. Límite de detección (LOD) mediante PCR en tiempo real

Se muestran los valores obtenidos tras la amplificación del gen *18S rRNA* específico para *P. falciparum* utilizando una muestra con cantidad de parásitos conocida. A partir de la curva de dilución, se determinó el LOD de 1.2 parásitos/µL, correspondiente al punto más bajo en el que se obtuvo una amplificación detectable. En la Tabla 13 se observa que los valores de Ct promedio aumentaron progresivamente conforme disminuyó la carga parasitaria, evidenciando la relación inversa entre ambas variables. Además, se incluyó una columna con el logaritmo de este último, ya que fue necesario

para construir la curva de cuantificación y aplicar la ecuación de la recta en la estimación de parasitemias desconocidas.

Tabla 13. Curva de dilución para estimar el Límite de Detección

Dilución	Parásitos/µL	Ct promedio	Log (Parásitos/µL)
10^0	490000	18.43	5.690
10^{-1}	49000	21.36	4.690
10^{-2}	4900	25.00	3.690
10^{-3}	490	28.21	2.690
10^{-4}	49	32.06	1.690
10^{-5}	4.9	34.97	0.690
$2^{-1}x\,10^{-5}$	2.450	36.61	0.389
$2^{-2}x\,10^{-5}$	1.225	37.10	0.088

Posteriormente, se elaboró la curva de cuantificación para determinar la parasitemia de las muestras problema. Antes de su aplicación, se evaluó la eficiencia del ensayo, que se mantuvo dentro del rango aceptable (90 – 110%), y el coeficiente de determinación (R^2), que fue cercano a 1, lo cual indicó una adecuada linealidad (Figura 11).

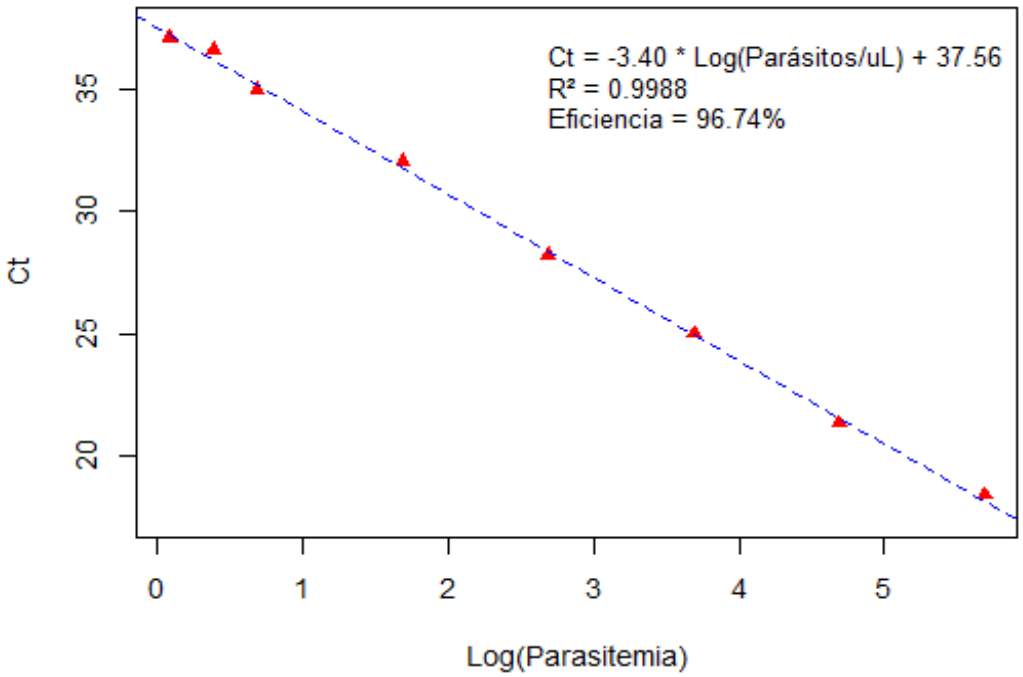


Figura 11: Curva estándar para la cuantificación de parásitos *P. falciparum*. **Ct**: *Cycle Threshold*, **Log (Parasitemia)**: Logaritmo de la cantidad de parásitos por microlitro obtenido por PCR en tiempo real, $\boldsymbol{R^2}$**:** Coeficiente de determinación.

Este ensayo previo se realizó con el objetivo de estimar la carga parasitaria de cada muestra, siguiendo los lineamientos establecidos. La curva estándar presentó una eficiencia del 96.7% y $\boldsymbol{R^2}$ de 0.99.

En total, se procesaron 142 muestras positivas a *P. falciparum*; de estas, solo una muestra (0.7%), proveniente de la región Amazonas, fue descartada debido a su baja parasitemia. Finalmente, 49 muestras de Amazonas y 92 de Loreto fueron incluidas para la genotipificación de los genes *pfhrp2/3*.

Tabla 14. Parasitemia promedio (par/µL) en muestras positivas a *P. falciparum* según su región de procedencia.

Región	**No de muestras**	**Promedio (parásitos/µL) ± IC95%**	**Mínimo (parásitos/µL)**	**Máximo (parásitos/µL)**
Amazonas	49	417.7 ± 301.1	8.7	6384.3
Loreto	92	6229.1 ± 5372.7	6.1	71479.0

La carga parasitaria promedio fue mayor en las muestras procedentes de la región Loreto (6229.1 parásitos/µL, IC95%: ± 5372.7) en comparación con las de la región Amazonas (417.7 parásitos/µL, IC95%: ±301.1). Se observó una amplia variabilidad entre las muestras dentro de cada región, evidenciada por los amplios intervalos de confianza (IC95%) y la diferencia entre los valores mínimos y máximos.

V.5. Genotipificación del gen *pfhrp2* y su comparación mediante los protocolos de amplificación enfocados en los exones 1 y 2.

La genotipificación del gen *pfhrp2* se realizó mediante dos reacciones de PCR convencional: la primera dirigida al exón 1 y la segunda al 2. En este estudio se observó una marcada variabilidad en la frecuencia de los perfiles de deleción del gen *pfhrp2* entre los tres distritos evaluados. En Río Santiago, todas las muestras analizadas (n=49) presentaron deleción total (100%), lo que evidencia la ausencia de ambos exones. En contraste, en Andoas (n=35) se registró una alta prevalencia de deleciones totales (74.3%), mientras que el 25.7% de las muestras conservaron ambos exones (presencia). Por otro lado, en Trompeteros (n=57) se identificó el perfil de deleción parcial, caracterizado por la presencia exclusiva del exón 1 en el 35.1% de las muestras; adicionalmente, el 17.5% mostró deleción total, y el 47.4% conservó ambos exones (Figura 12).

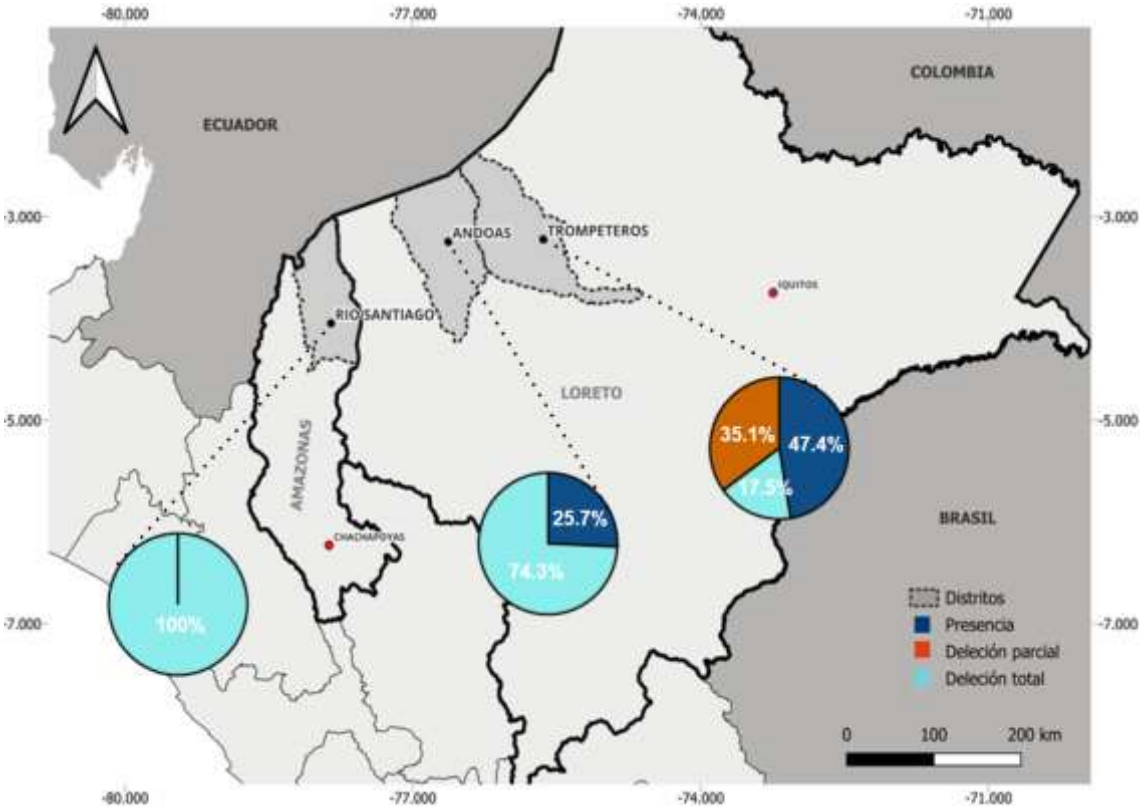


Figura 12: Distribución de los perfiles de caracterización del gen *pfhrp2* por cada distrito estudiado.

Posteriormente, se evaluaron las diferencias en la frecuencia de los tipos de deleción entre los tres distritos mediante la prueba exacta de Fisher para comparaciones por pares. Los resultados evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en todos los casos ($p < 0.001$, con corrección de Bonferroni) (Tabla 15), lo que indica que la frecuencia y el tipo de deleción varían considerablemente entre las localidades estudiadas.

Tabla 15. Resultados de la prueba exacta de Fisher con corrección de Bonferroni para la comparación de frecuencias de deleciones del gen *pfhrp2* entre distritos.

Comparación entre distritos	***p-value* corregido con Bonferroni**
Río Santiago vs Andoas	0.00058
Río Santiago vs Trompeteros	6.51×10^{-14} ($p < 0.001$)
Andoas vs Trompeteros	0.00038

Finalmente, el análisis de concordancia entre el nuevo protocolo de caracterización (exón 1) y el protocolo previamente empleado (exón 2) mostró una concordancia sustancial en los resultados de presencia y deleción del gen *pfhrp2* (índice *kappa* = 0.656) (Tabla 16).

Tabla 16. Matriz de contingencia que muestra la concordancia entre ambos protocolos de detección del gen *pfhrp2* (índice *kappa* = 0.656)

		Deleción del exón 2 del gen *pfhrp2*	
		Si	**No**
Deleción del exón 1 del gen *pfhrp2*	**Si**	92	0
	No	23	36

V.6. Genotipificación del gen *pfhrp3*

Esta genotipificación, a diferencia del gen *pfhrp2*, se realizó utilizando el exón 2 como blanco de amplificación. Por este motivo, las muestras se clasificaron únicamente en dos categorías: presencia y ausencia del gen. La distribución de estas categorías por distrito se muestra en la Figura 13 y se detalla numéricamente en la Tabla 17.

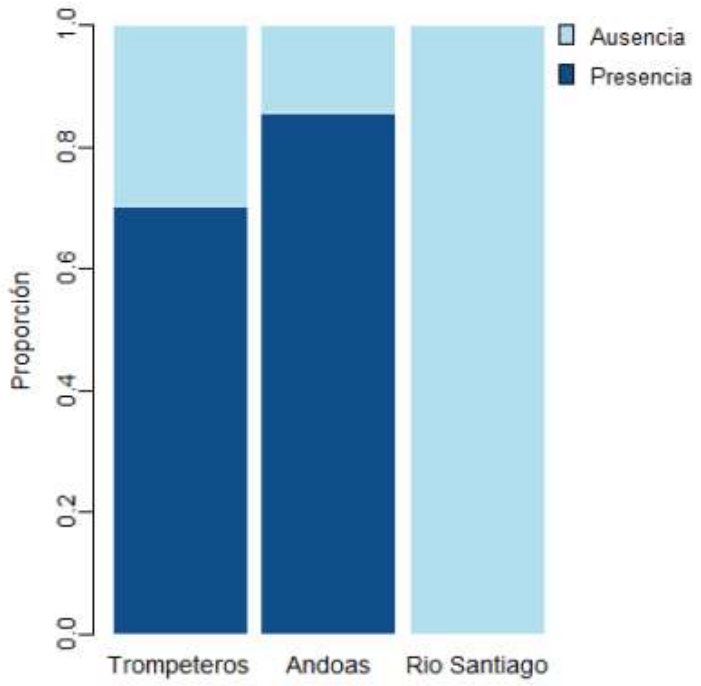


Figura 13: Frecuencia de presencia y ausencia del gen *pfhrp3* (exón 2) en los tres distritos estudiados.

Tabla 17: Distribución de la presencia y ausencia del gen *pfhrp3* (exón 2) en los distritos evaluados.

Distrito	Presencia (%)	Ausencia (%)	N
Río Santiago	0 (0%)	49 (100%)	49
Andoas	30 (85.7%)	5 (14.3%)	35
Trompeteros	40 (70.2%)	17 (29.8%)	57
Test de Fisher: $p = 2.2 \times 10^{-16}$			

Se observó una ausencia total del gen *pfhrp3* en las muestras procedentes del distrito de Río Santiago (100%), mientras que en Andoas y Trompeteros las frecuencias de deleción fueron del 14.3% y 29.8%, respectivamente. El test exacto de Fisher indicó

diferencias estadísticamente significativas entre los distritos (*p-value* = 2.2 x 10^{-16}). Para determinar entre cuáles existían tales diferencias, se realizó nuevamente el análisis mediante comparaciones por pares (Tabla 18), aplicando la corrección de Bonferroni (umbral de significancia ajustado: 0.05/3 = 0.016).

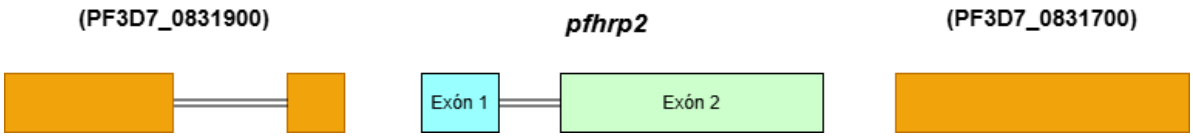
Tabla 18: Resultados de la prueba exacta de Fisher con corrección de Bonferroni para la comparación de las frecuencias de deleciones del gen *pfhrp3* (exón 2) entre distritos.

Comparación entre distritos	***p-value* corregido con Bonferroni**
Trompeteros vs Andoas	3.90 x 10^{-01}
Río Santiago vs Trompeteros	2.17 x 10^{-15}
Andoas vs Río Santiago	1.80 x 10^{-17}

Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas entre Río Santiago y Trompeteros, así como entre Andoas y Río Santiago ($p < 0.01$), mientras que no se observaron diferencias entre Trompeteros y Andoas ($p = 0.39$). Esto indica que las frecuencias de deleciones en el exón 2 del gen *pfhrp3* difieren significativamente entre Río Santiago y los otros dos distritos, sugiriendo una posible variación geográfica en la distribución de estas deleciones.

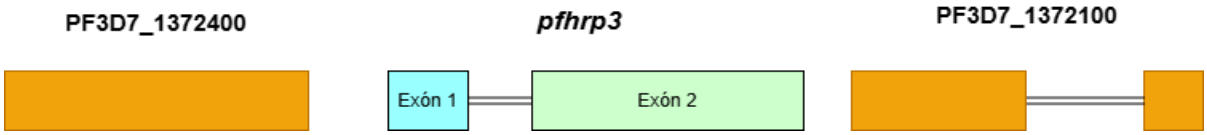
V.7. Genotipificación de las regiones flanqueantes

El análisis de las regiones flanqueantes permitió identificar los patrones de presencia y deleción más allá de los genes *pfhrp2*/*3*. Esta evaluación se realizó únicamente en los distritos de Río Santiago y Andoas, donde se contó con cantidad suficiente de ADN para el ensayo. Los resultados obtenidos se resumen en las Figuras 14 y 15.



Distrito	N	PF3D7_0831900		PF3D7_0831700	
		+	-	+	-
Río Santiago	49	0 (0%)	49 (100%)	49 (100%)	0 (0%)
Andoas	31	6 (19.4%)	25 (80.6%)	29 (93.5%)	2 (6.5%)

Figura 14. Estructura de las regiones flanqueantes del gen *pfhrp2* (cromosoma 8) y su distribución en Río Santiago y Andoas



Distrito	N	PF3D7_1372400		PF3D7_1372100	
		+	-	+	-
Río Santiago	49	49 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	49 (100%)
Andoas	31	28 (90.3%)	3 (9.7%)	29 (93.5%)	2 (6.5%)

Figura 15. Estructura de las regiones flanqueantes del gen *pfhrp3* (cromosoma 13) y su distribución en Río Santiago y Andoas

En el cromosoma 8, la región *downtream* (PF3D7_0831700) se detectó en el 100% de las muestras de Río Santiago y en el 93.5% de Andoas. En contraste, la región *upstream* (PF3D7_0831900) estuvo ausente en todas las muestras (100 %) de Río Santiago y presente en el 19.4% de Andoas (Figura 14).

Por su parte, en el cromosoma 13, se observó un patrón distinto. La región *upstream* (PF3D7_1372400) estuvo presente en la totalidad de las muestras (100%) de Río Santiago. En Andoas, la región *downtream* (PF3D7_1372100) se detectó en el 93.5% de las muestras y la *upstream* en el 90.3% (Figura 15).

V.8. Caracterización de las deleciones en los genes *pfhrp2/3* y sus regiones flanqueantes

La integración de los resultados obtenidos para los genes *pfhrp2/3*, junto con sus regiones flanqueantes, permitió identificar distintos perfiles genéticos en los distritos evaluados. Esta información se resume en la Figura 18.

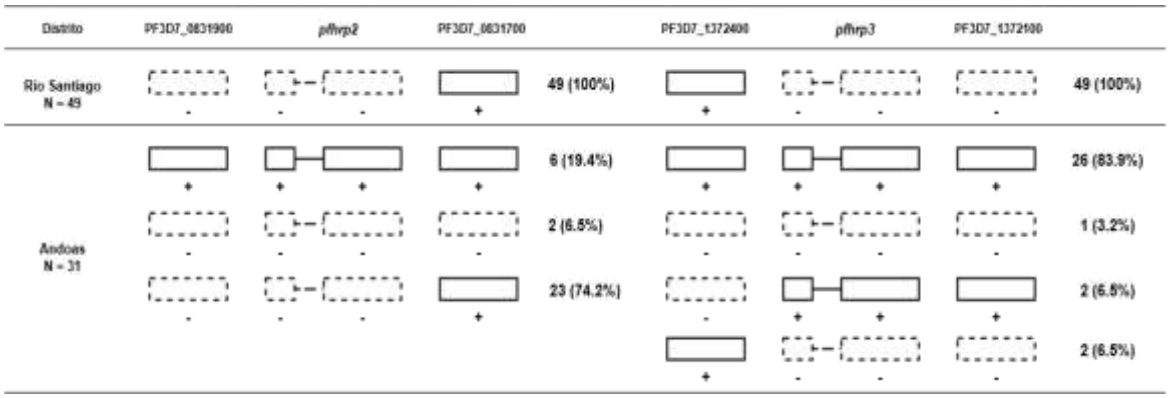


Figura 18. Diversidad de los perfiles genéticos entre los distritos de Río Santiago y Andoas

En el distrito de Río Santiago se observó un único perfil tanto en el cromosoma 8 como en el 13, mientras que en Andoas se identificaron tres perfiles diferentes para el gen *pfhrp2* y cinco para el gen *pfhrp3*. Para el cromosoma 8, el perfil más frecuente en Andoas coincidió con el observado en Río Santiago, caracterizado por la presencia exclusiva de la región *downstream* (PF3D7_0831700) (74.2%). En contraste, el perfil menos común correspondió a la deleción completa del locus (6.5%). En el cromosoma 13, el perfil predominante en Andoas fue la presencia del gen *pfhrp3* y de sus regiones flanqueantes (83.9%), mientras que los demás perfiles se presentaron con frecuencias menores al 5%.

V.9. Reporte de los perfiles de caracterización de las deleciones en los genes *pfhrp2/3* entre el distrito de Río Santiago y los distritos de la región de Loreto.

La Figura 19 muestra el perfil de caracterización de los genes *pfhrp2/3* en los tres distritos evaluados. Para el gen *pfhrp2* se consideró el término “deleción” cuando al menos uno de sus exones estuvo ausente.

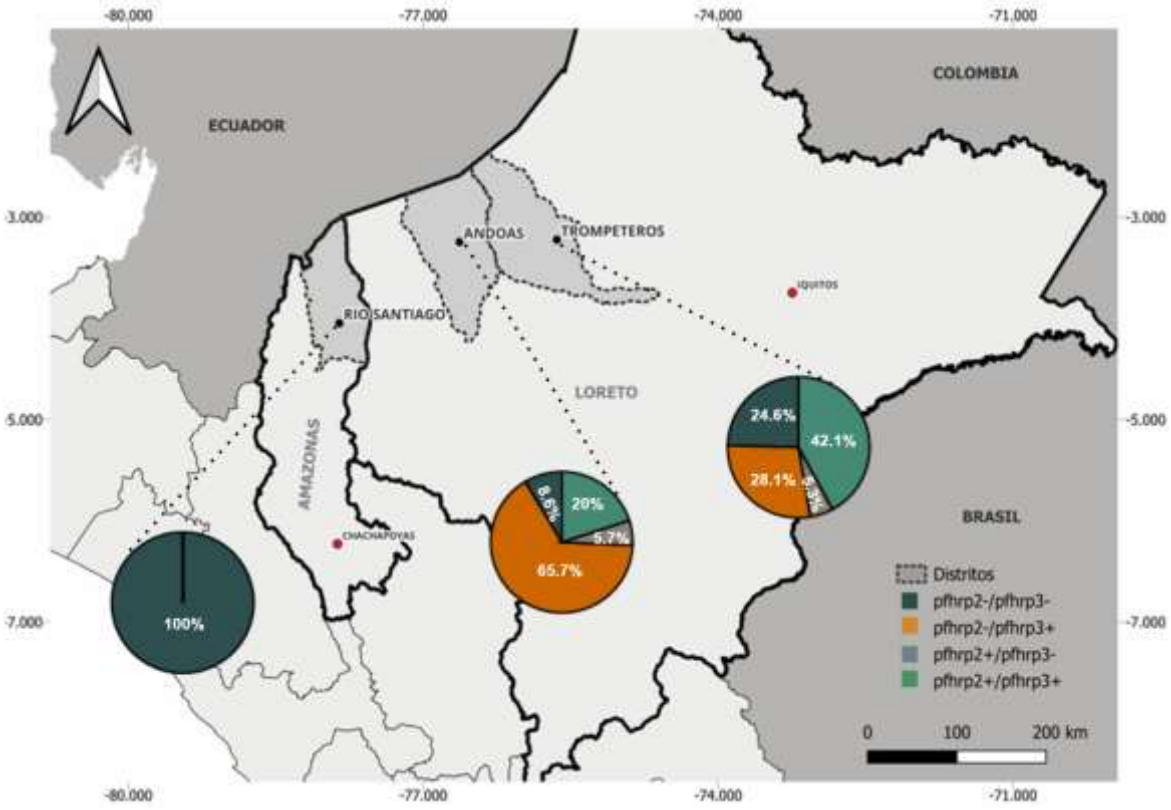


Figura 19. Frecuencia de los perfiles de caracterización enfocados en los genes *pfhrp2* y *pfhrp3*

En el distrito de Río Santiago, se observó la deleción simultánea de ambos genes (*pfhrp2* y *pfhrp3*) en el total de las muestras (100%). En Andoas, predominó la deleción del gen *pfhrp2* (65.7%), seguida de la presencia de ambos genes (20%). En Trompeteros, el patrón más frecuente fue la conservación de *pfhrp2* y *pfhrp3* (42%), mientras que la deleción del gen *pfhrp2* representó el 28.1%. En conjunto, estos resultados reflejan una marcada heterogeneidad genética entre los distritos, con diferencias notables entre Río Santiago y las localidades de Loreto.

VI. DISCUSIÓN

Desde los primeros reportes de *P. falciparum* con deleción de los genes *pfhrp2/3*, se propuso que estas variantes podrían expandirse gradualmente por la Amazonía peruana e incluso cruzar fronteras hacia países vecinos (Gamboa et al. 2010). Con el tiempo, esta predicción se confirmó en distintas regiones de Sudamérica, incluidas comunidades remotas donde la implementación de estrategias de vigilancia aún enfrenta limitaciones operativas.

Según la comparación de los perfiles de deleción en los genes *pfhrp2/3* en aislamientos recientes procedentes del distrito de Río Santiago y de otros distritos remotos de la región Loreto, realizado en este estudio, se observó que en Río Santiago se presentó exclusivamente un único genotipo con doble deleción (100%), en Andoas predominó la deleción de *pfhrp2* (65.7%) y en Trompeteros se detectó con mayor frecuencia la conservación de ambos genes (42.1%). Estas diferencias corroboran la premisa inicial de que los patrones genéticos entre Río Santiago y las otras áreas evaluadas presentan contrastes marcados. La comparación detallada de los perfiles sugiere posibles explicaciones evolutivas y epidemiológicas. En primer lugar, la similitud entre los perfiles de Andoas y Trompeteros podría reflejar cierto grado de conectividad entre ambas zonas, lo que favorecería el intercambio de linajes circulantes. Asimismo, el patrón compartido entre estos distritos podría deberse a que los parásitos que actualmente circulan en ellos provengan de un antecesor común, posiblemente originado en áreas urbanas más conectadas como Iquitos, donde el flujo de personas y la movilidad epidemiológica son mayores. Estas hipótesis fueron anteriormente demostradas mediante análisis genómicos por Cabrera-Sosa et al. (2024) y Kattenberg et al. (2023) con muestras de localidades urbanas previas al 2020. En contraste con estos distritos, la marcada homogeneidad observada en Río Santiago sugiere un escenario distinto: dada la complejidad logística para acceder a esta zona, es plausible que un linaje único haya logrado establecerse y expandirse localmente por efecto fundador, originando la

uniformidad genética registrada en este distrito. Además, existen algunos ejemplos en otros contextos geográficos donde se han reportado frecuencias muy elevadas de deleciones, por ejemplo, en el continente africano. En Djibouti, se han informado niveles de dobles deleciones de *pfhrp2/3* de hasta ~68% y según Rogier et al. (2022), se han desarrollado de forma local, sin haber sido importado de países con altos índices de dobles deleciones como Etiopía y Eritrea. Eritrea es uno de los casos más emblemáticos con dobles deleciones llegando incluso a ~80% en algunas localidades, Agaba et al. (2019) concluyeron que este fenómeno se debió a su asociación a escenarios de baja transmisión y uso prolongado de pHRP2, que pudieron favorecer la expansión de estos genotipos.

En comparación con el único antecedente para la región Amazonas (Gamboa et al. 2010), los resultados del presente estudio muestran una diferencia notable del panorama genético. Entre 2006 y 2008, solo una muestra presentaba la doble deleción, mientras que el resto exhibía perfiles heterogéneos, probablemente limitados por el tamaño muestral reducido. Los datos actuales revelan, por el contrario, la circulación de un genotipo dominante con doble deleción en todas las muestras de Río Santiago, respaldado por un número considerablemente mayor de casos analizados, lo que permitió obtener inferencias más robustas sobre la transmisión del parásito.

El análisis simultáneo de los genes *pfhrp2/3* y sus regiones flanqueantes mostró contrastes definidos entre Río Santiago y el resto de los distritos. En Río Santiago se identificó un único perfil por cromosoma, caracterizado por la conservación del segmento *downstream* y la ausencia del *upstream* en *pfhrp2*, así como la detección exclusiva de la sección *upstream* en *pfhrp3*. En cambio, Andoas exhibió la mayor diversidad en el cromosoma 13, lo que sugiere la presencia de múltiples variantes en circulación. Este tipo de análisis permite no solo delimitar la extensión estructural de las deleciones, sino también discernir si corresponden a deleciones localizadas o a reordenamientos de mayor escala (Murillo et al. 2015, Biggs et al. 1989). La

conservación del extremo 5’ de *pfhrp2* junto con la deleción del 3’ en Río Santiago sugiere una pérdida que podría abarcar regiones contiguas del cromosoma 8. Además, en Andoas, la alta frecuencia del segmento *downstream* combinada con la reducida detección del *upstream* apunta a un evento de menor extensión. Por último, respecto a *pfhrp3*, mientras en Río Santiago la deleción parecería concentrarse en el extremo 5’, en Andoas el gen se conserva mayormente intacto (presencia).

La similitud entre Andoas y Nueva Jerusalén coincide con lo mencionado por Cabrera-Sosa et al. (2024), quienes reportaron una relación genética entre ambas localidades mediante análisis de identidad por descendencia (IBD). Como se muestra en la Figura 19, la doble deleción no fue prevalente en ninguno de estos distritos, a diferencia de Río Santiago. En contraste, la presencia del gen *pfhrp3* y la expresión de su proteína puede reducir el nivel de resultados falsos negativos, ya que tiene el potencial de reaccionar de forma cruzada con los anticuerpos monoclonales de las PDRs (Kojom & Singh 2020), por ello actualmente, no es tan crítica la situación en ambos distritos. Sin embargo, la doble deleción compromete gravemente la eficacia diagnóstica de las PDRs dirigidas a la proteína HRP2, debido a que estas pruebas no serán capaces de detectar infecciones por estas cepas generando falsos negativos y, en consecuencia, retraso o falta de tratamiento. Como se ha mencionado anteriormente, en el distrito de Río Santiago, así como en otros aledaños aún se siguen utilizando PDRs por su fácil manejo e interpretación a diferencia de la microscopía, por lo que se sugiere considerar otras alternativas diagnósticas como PDRs enfocadas en otras proteínas como pLDH o aldolasa, métodos sofisticados como PCR o LAMP, según sea conveniente.

Por otro lado, estudios anteriores ya sospechaban la presencia de cepas con deleciones parciales en Sudamérica, donde solo una parte del gen *pfhrp2* o *pfhrp3* pueden estar presentes (Costa et al. 2021, Figueroa-Ildefonso, 2023, Cabrera-Sosa, 2024). Por ello, se requería de protocolos de amplificación enfocados en toda la sección de los genes.

Actualmente, en el laboratorio de Malaria: Parásitos y Vectores (UPCH) se cuenta con un protocolo de PCR convencional dirigido a una sección del exón 2 de los genes *pfhrp2/3* (Quispe, 2017, Figueroa-Ildefonso, 2023); por ello, era necesaria la incorporación del exón 1 como sección complementaria. En ese contexto, la estandarización de un protocolo de PCR convencional específicamente dirigido al exón 1 de *pfhrp2/3* constituye un avance significativo para mejorar la sensibilidad en la detección de deleciones parciales, ya que permite describir con mayor precisión los tipos de reorganización del material genético del parásito.

El protocolo del gen *pfhrp2* se optimizó en un volumen final de 25 µL, ajustando la concentración de reactivos, la temperatura de *annealing* y el número de ciclos para maximizar la sensibilidad. Esta optimización permitió obtener amplificaciones reproducibles y mayor robustez, incluso en muestras con baja parasitemia, lo cual es especialmente ventajoso en contextos de genotipificación (Figura 7). Para ello, la ecuación de Wallace (Hasan, 2021), que relaciona la Tm y la Ta, proporcionó un punto de partida esencial. Durante la estandarización, se observó amplificación inespecífica en la cepa Dd2 a temperaturas de *annealing* entre 52 y 62°C. Dado que esta línea presenta deleción total en *pfhrp2* (Walker-Jonah et al. 1992), dichas bandas correspondieron a falsos positivos, lo que motivó elevar la temperatura hasta 63.6°C, punto en el que solo se amplificaron los controles positivos 3D7 y HB3. Este comportamiento puede explicarse porque, a bajas temperaturas, los *primers* tienden a unirse parcialmente a regiones homólogas del genoma, generando bandas inespecíficas. En efecto, el alineamiento entre los *primers* y el genoma de Dd2 (Anexo 3) mostró una alta probabilidad de interacción, sustentando la afinidad suficiente para generar un producto definido.

En el caso del protocolo dirigido al gen *pfhrp3*, la estandarización también se desarrolló en un volumen de 25 µL, aunque con variaciones en la concentración de *primers* y el número de ciclos. A diferencia de *pfhrp2*, no se evidenció inespecificidad dentro del

rango aproximado de 5°C sugerido por la ecuación de Wallace; sin embargo, se generaron numerosas bandas inespecíficas al procesar muestras infectadas con *P. falciparum* (Figura 8). Esto se debe, probablemente, al alto contenido de ADN humano presente en las muestras clínicas, que suele superar ampliamente al ADN parasitario (Joice et al. 2014). La elevada proporción de productos inespecíficos dificultó discriminar correctamente la presencia o ausencia de la región objetivo.

Inicialmente, se sospechó que los *primers* también se alineaban con secuencias del genoma humano, ya que la estandarización previa se realizó únicamente con ADN parasitario puro. Por ello, se ejecutaron ensayos con ADN humano, parasitario y mezclas de ambos (Figura 9), además de un alineamiento BLASTn de los *primers* contra el genoma humano (Tabla 12), el cual arrojó *e-values* de 1 y 42. Aunque la homología fue baja, estos resultados evidencian un posible apareamiento inespecífico cuando el ADN humano está presente. Esta situación destaca la importancia de considerar el genoma humano durante el diseño de *primers* en enfermedades donde ambos ADN coexisten en la muestra. Es importante mencionar que tanto el protocolo de la OMS como el de Akinyi et al. (2013) utilizaron estos *primers* en una PCR anidada; en cambio, en este estudio se emplearon únicamente en una PCR convencional. La ausencia de la reacción interna explica la elevada inespecificidad observada, ya que la segunda ronda de amplificación en una reacción anidada eleva drásticamente la especificidad (Clinica Chimica Acta, 2006). Debido a esta limitación, se descartó la amplificación del exón 1 de *pfhrp3*.

Como parte de la validación del protocolo para el exón 1 de *pfhrp2*, se secuenció el producto mediante la metodología de Sanger. El análisis *in silico* predijo un tamaño esperado de 308 pb; sin embargo, la secuencia consenso alcanzó 310 pb. Esta diferencia puede explicarse por fenómenos de desplazamiento de la ADN polimerasa, característicos de regiones con motivos repetitivos, como los numerosos bloques TA presentes en el intrón (Sehn, 2015). Adicionalmente, la presencia de residuos de *primers*

no purificados también podría sumar algunos nucleótidos. No obstante, la secuencia consenso mostró un alineamiento adecuado con el genoma de referencia de la cepa 3D7, por lo que la genotipificación final consideró el exón 1 y exón 2 para *pfhrp2*, y únicamente el exón 2 para *pfhrp3*, analizándose así las deleciones parciales correspondientes. Posteriormente, se evaluó la sensibilidad del protocolo de *pfhrp2* (exón 1) utilizando las cepas 3D7 y HB3. Se observaron diferencias en su detección atribuibles a factores como variaciones en la eficiencia de extracción, calidad del ADN, su conformación o presencia de contaminantes (Pruvot et al. 2013). En estas condiciones, la cepa 3D7 mostró mayor sensibilidad que HB3.

La cuantificación de las muestras se realizó mediante ensayos de PCR en tiempo real dirigidos al gen *18S ribosomal*, obteniéndose un LOD de 1.2 parásitos/µL, con una eficiencia del 96.7% y un R^2 de 0.99. Dado que el gen *18S* presenta múltiples copias y alta conservación (Yabuki et al. 2024), la qPCR permitió detectar incluso niveles muy bajos de parasitemia. Esto resulta esencial para interpretar adecuadamente los resultados negativos de PCR convencional, diferenciando entre una verdadera deleción y un falso negativo debido a baja carga parasitaria. En este estudio solo se descartó 1 de 142 muestras.

Con los ensayos validados, se determinaron los perfiles de deleción del gen *pfhrp2* en los tres distritos analizados (Figura 12). Río Santiago presentó 100% de deleción total, mientras que en Andoas se observó 74.3% de deleción total y un 25.7% de muestras con ambos exones presentes. Trompeteros mostró los tres perfiles: 17.5% de deleción total, 35.1% de deleción parcial y 47.4% de presencia completa del gen. Además, la concordancia entre los protocolos dirigidos al exón 1 y exón 2 se evaluó mediante el índice Kappa de Cohen, obteniéndose 0.656, lo que indica una concordancia sustancial. Las discrepancias surgieron debido a que el protocolo dirigido solo al exón 2 clasifica como deleción total casos que, en realidad, corresponden a deleciones parciales. En cambio, el protocolo del exón 1 brinda una caracterización más precisa de la estructura

del gen, por lo que su incorporación en estudios de la Amazonía peruana puede aportar información más detallada para investigaciones posteriores. Este hallazgo concuerda con lo reportado por Costa et al. (2021), quienes demostraron que los protocolos dirigidos a ambos exones poseen una mayor capacidad de detección utilizando muestras brasileñas. En su estudio, la PCR nested orientada ambos exones del gen *pfhrp2* (n=60, 82%) detectó más deleciones que el protocolo convencional del exón 2 (n=13, 18%). Estos resultados respaldan lo observado en este trabajo, donde la menor concordancia del protocolo del exón 2 se debió principalmente a la sobreestimación de deleciones completas. Los protocolos tradicionales enfocados en el exón 2 interpretaban un resultado negativo por PCR como indicativo de la "pérdida total del gen". La implementación del protocolo enfocado en el exón 1 permitió identificar deleciones parciales, observadas en el distrito de Trompeteros, donde el 35,1% de las muestras presentó exón 1 positivo y exón 2 ausente o delecionado.

En el caso del gen *pfhrp3*, el exón 2 estuvo ausente en el 100% de muestras de Río Santiago, y en el 14.3% y 29.8% de Andoas y Trompeteros, respectivamente (Tabla 17). El test exacto de Fisher evidenció diferencias significativas entre distritos ($p = 2.2 \times 10^{-16}$), y tras aplicar la corrección de Bonferroni (umbral = 0.01), se confirmó que las diferencias entre Río Santiago y los distritos de Loreto eran altamente significativas.

Uno de los hallazgos más relevantes del estudio fue la identificación de un único perfil en las muestras de Río Santiago. Tras el programa PAMAFRO (2005 – 2010), la región Amazonas no recibió intervención continua debido a que el foco crítico se mantuvo en Loreto (Saavedra-Samillán et al. 2024), lo que se reflejó en más de 10 años sin reportes de *P. falciparum* (Montenegro et al. 2021). El resurgimiento de casos en 2019 permite suponer que un evento fundador, posiblemente la introducción de un parásito clonal con doble deleción pudo haberse establecido en un contexto de aislamiento geográfico y baja conectividad humana, facilitando su expansión sin competencia genética, por lo tanto, se podría asumir que el distrito de Río Santiago pudo haber actuado como una

“isla biológica” asociada al aislamiento lo que habría conllevado a la fijación de un único genotipo.

Finalmente, es importante señalar que, desde 2019, la OMS recomienda abandonar el uso de PDRs basadas en HRP2 en zonas donde la prevalencia de deleciones en *pfhrp2/3* sea ≥5% (WHO, 2023). Países como Etiopía, Guinea Ecuatorial, Eritrea y Sudán ya han comenzado a implementar estas recomendaciones (Golassa et al. 2020, Mihreteab et al. 2021, Berzosa et al. 2020, Boush et al. 2020). En ese sentido, este estudio proporcionó información crucial sobre la caracterización de ambos genes en distritos remotos y de difícil acceso, contribuyendo a fortalecer las estrategias nacionales de control y eliminación de malaria.

VII. CONCLUSIONES

- La comparación de los perfiles de deleción de *pfhrp2/3* mostró diferencias significativas ($p < 0.001$) entre Río Santiago y los dos distritos remotos de Loreto, lo que evidencia una variabilidad entre los genotipos detectados mediante los protocolos dirigidos hacia ambos exones.
- La caracterización de los perfiles genéticos mostró una prevalencia del 100% de doble deleción de *pfhrp2/3* en Río Santiago, así como la presencia de deleciones parciales de *pfhrp2* (35%) en Trompeteros.
- La evaluación de concordancia evidenció que el protocolo dirigido al exón 1 proporciona una mayor precisión que el protocolo dirigido al exón 2 ($\kappa = 0.656$), evitando la subestimación de deleciones parciales como deleciones completas.

- Las condiciones de reacción de la PCR convencional establecidas en este estudio permiten detectar el exón 1 del gen *pfhrp2* hasta un límite de 6 parásitos/µL.

- Los *primers* del exón 1 del gen *pfhrp3* se alinean parcialmente con secuencias del genoma humano descartando su uso en una PCR convencional.

VIII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda rehacer los *primers* para el exón 1 del gen *pfhrp3* y luego complementar la amplificación del exón 2 con la sección complementaria de los genes *pfhrp2/3* utilizando una PCR multiplex para reducir el tiempo de procesamiento.
- Es importante continuar con estudios moleculares en zonas de difícil acceso para confirmar que los resultados negativos de las PDRs, usualmente utilizadas en estas zonas, son debidos a la ausencia del parasito y no a la presencia de la deleción del gen *pfhrp2.*
- Realizar estudios genómicos del parásito para comprender mejor los patrones de transmisión y su estructura poblacional relacionados a los perfiles de deleción *pfhrp2/3* encontradas aquí.
- Realizar vigilancia molecular en zonas remotas de difícil acceso por la alta prevalencia de deleciones *pfhrp2/3* observada en Río Santiago para identificar con mayor precisión los casos no detectados por las PDRs.
- Se debe tomar conciencia del tipo de diagnóstico que se debe utilizar en las comunidades del distrito de Río Santiago considerando el uso de otras PDRs siguiendo las directrices de la OMS.
- Fomentar el uso de múltiples marcadores que puedan reemplazar a la PDR enfocada en la proteína HRP2.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1Library.co. (s.f.). Comunidades indígenas: Ubicación y denominación por distritos. https://1library.co/article/comunidades-ind%C3%ADgenas-ubicaci%C3%B3n-y-denominaci%C3%B3n-por-distritos.zgw1n52y

Abdallah, J. F., Okoth, S. A., Fontecha, G. A., Torres, R. E., Banegas, E. I., Matute, M. L., Bucheli, S. T., Goldman, I. F., de Oliveira, A. M., Barnwell, J. W., & Udhayakumar, V. (2015). Prevalence of *pfhrp2* and *pfhrp3* gene deletions in Puerto Lempira, Honduras. Malaria journal, 14, 19. https://doi.org/10.1186/s12936-014-0537-7

Agaba, B. B., Yeka, A., Nsobya, S., Arinaitwe, E., Nankabirwa, J., Opigo, J., Mbaka, P., Lim, C. S., Kalyango, J. N., Karamagi, C., & Kamya, M. R. (2019). Systematic review of the status of *pfhrp2* and *pfhrp3* gene deletion, approaches and methods used for its estimation and reporting in *Plasmodium falciparum* populations in Africa: review of published studies 2010-2019. Malaria journal, 18(1), 355. https://doi.org/10.1186/s12936-019-2987-4

Akinyi Okoth, S., Abdallah, J. F., Ceron, N., Adhin, M. R., Chandrabose, J., Krishnalall, K., Huber, C. S., Goldman, I. F., Macedo de Oliveira, A., Barnwell, J. W., & Udhayakumar, V. (2015). Variation in *Plasmodium falciparum* Histidine-Rich Protein 2 (*Pfhrp2*) and Plasmodium falciparum Histidine-Rich Protein 3 (*Pfhrp3*) Gene Deletions in Guyana and Suriname. PloS one, 10(5), e0126805. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126805

Akinyi, S., Hayden, T., Gamboa, D., Torres, K., Bendezu, J., Abdallah, J. F., Griffing, S. M., Quezada, W. M., Arrospide, N., De Oliveira, A. M., Lucas, C., Magill, A. J., Bacon, D. J., Barnwell, J. W., & Udhayakumar, V. (2013). Multiple genetic origins of histidine-rich protein 2 gene deletion in *Plasmodium falciparum* parasites from Peru. Scientific reports, 3, 2797. https://doi.org/10.1038/srep02797

Aryal, S. (2023). Real-Time PCR: Principle, Process, Markers, Advantages, Applications. Microbe Notes. https://microbenotes.com/real-time-pcr-principle-process-markers-advantages-applications/

Baird, J. K., Valecha, N., Duparc, S., White, N. J., & Price, R. N. (2016). Diagnosis and Treatment of *Plasmodium vivax* Malaria. The American journal of tropical medicine and hygiene, 95(6 Suppl), 35–51. https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0171

Baker, J., McCarthy, J., Gatton, M., Kyle, D. E., Belizario, V., Luchavez, J., Bell, D., & Cheng, Q. (2005). Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 (PfHRP2) and its effect on the performance of PfHRP2-based rapid diagnostic tests. The Journal of infectious diseases, 192(5), 870–877. https://doi.org/10.1086/432010

Baldeviano, G. C., Okoth, S. A., Arrospide, N., Gonzalez, R. V., Sánchez, J. F., Macedo, S., Conde, S., Tapia, L. L., Salas, C., Gamboa, D., Herrera, Y., Edgel, K. A., Udhayakumar, V., & Lescano, A. G. (2015). Molecular Epidemiology of *Plasmodium falciparum* Malaria Outbreak, Tumbes, Peru, 2010-2012. Emerging infectious diseases, 21(5), 797–803. https://doi.org/10.3201/eid2105.141427

Bendezu, J., Torres, K., Villasis, E., Incardona, S., Bell, D., Vinetz, J., & Gamboa, D. (2022). Geographical distribution and genetic characterization of *pfhrp2* negative

Plasmodium falciparum parasites in the Peruvian Amazon. PloS one, 17(11), e0273872. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0273872

Bennink, S., Kiesow, M. J., & Pradel, G. (2016). The development of malaria parasites in the mosquito midgut. Cellular microbiology, 18(7), 905–918. https://doi.org/10.1111/cmi.12604

Berzosa, P., González, V., Taravillo, L., Mayor, A., Romay-Barja, M., García, L., Ncogo, P., Riloha, M., & Benito, A. (2020). First evidence of the deletion in the *pfhrp2* and *pfhrp3* genes in *Plasmodium falciparum* from Equatorial Guinea. Malaria journal, 19(1), 99. https://doi.org/10.1186/s12936-020-03178-9

Beshir, K. B., Parr, J. B., Cunningham, J., Cheng, Q., & Rogier, E. (2022). Screening strategies and laboratory assays to support *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein deletion surveillance: where we are and what is needed. Malaria journal, 21(1), 201. https://doi.org/10.1186/s12936-022-04226-2

Biggs, B. A., Kemp, D. J., & Brown, G. V. (1989). Subtelomeric chromosome deletions in field isolates of *Plasmodium falciparum* and their relationship to loss of cytoadherence in vitro. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 86(7), 2428–2432. https://doi.org/10.1073/pnas.86.7.2428

Boush, M. A., Djibrine, M. A., Mussa, A., Talib, M., Maki, A., Mohammed, A., Beshir, K. B., Mohamed, Z., & Hajissa, K. (2020). *Plasmodium falciparum* isolate with *histidine-rich protein 2* gene deletion from Nyala City, Western Sudan. Scientific reports, 10(1), 12822. https://doi.org/10.1038/s41598-020-69756-8

Cabrera-Sosa, L. E. (2024). Vigilancia molecular de los parásitos de la malaria en comunidades remotas de la Amazonía peruana (Tesis doctoral, Universidad Peruana Cayetano Heredia). Repositorio Institucional UPCH. https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/15557/Vigilancia_CabreraSosa_Luis.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Cabrera-Sosa, L., Nolasco, O., Kattenberg, J. H., Fernandez-Miñope, C., Valdivia, H. O., Barazorda, K., Arévalo de Los Rios, S., Rodriguez-Ferrucci, H., Vinetz, J. M., Rosanas-Urgell, A., Van Geertruyden, J. P., Gamboa, D., & Delgado-Ratto, C. (2024). Genomic surveillance of malaria parasites in an indigenous community in the Peruvian Amazon. Scientific reports, 14(1), 16291. https://doi.org/10.1038/s41598-024-66925-x

Carey Ángeles, C. (2016). Situación y desafíos de la malaria en Loreto – Perú: Perspectivas hasta el año 2015. Organización Panamericana de la Salud. https://www3.paho.org/hq/dmdocuments/2016/2016-cha-6-situacion-desafios-loreto-carey.pdf?utm_source=chatgpt.com

Cheng, Q., Gatton, M. L., Barnwell, J., Chiodini, P., McCarthy, J., Bell, D., & Cunningham, J. (2014). *Plasmodium falciparum* parasites lacking histidine-rich protein 2 and 3: a review and recommendations for accurate reporting. Malaria journal, 13, 283. https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-283

Clinica Chimica Acta. (2006). Nested polymerase chain reaction, *363*(1-2), 201. https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/nested-polymerase-chain-reaction

Costa, G. L., Mascarenhas, M. E. P., Martin, T. O. G., Fortini, L. G., Louzada, J., Pereira, D. B., Aguiar, A. C. C., Carvalho, L. H., de Brito, C. F. A., Fontes, C. J. F., & de Sousa, T. N. (2021). A Comprehensive Analysis of the Genetic Diversity of *Plasmodium falciparum* Histidine-Rich Protein 2 (PfHRP2) in the Brazilian Amazon. Frontiers in cellular and infection microbiology, 11, 742681. https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.742681

Dirección General de Epidemiología. (DGE). (2025). Sala situacional metaxénicas – Ministerio de Salud del Perú. https://app7.dge.gob.pe/maps/sala_metaxenica/

Dorado, E. J., Okoth, S. A., Montenegro, L. M., Diaz, G., Barnwell, J. W., Udhayakumar, V., & Murillo Solano, C. (2016). Genetic Characterisation of *Plasmodium falciparum* Isolates with Deletion of the *pfhrp2* and/or *pfhrp3* Genes in Colombia: The Amazon Region, a Challenge for Malaria Diagnosis and Control. PloS one, 11(9), e0163137. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163137

Emslie, K. R., H McLaughlin, J. L., Griffiths, K., Forbes-Smith, M., Pinheiro, L. B., & Burke, D. G. (2019). Droplet Volume Variability and Impact on Digital PCR Copy Number Concentration Measurements. Analytical chemistry, 91(6), 4124–4131. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05828

Feleke, S. M., Reichert, E. N., Mohammed, H., Brhane, B. G., Mekete, K., Mamo, H., Petros, B., Solomon, H., Abate, E., Hennelly, C., Denton, M., Keeler, C., Hathaway, N. J., Juliano, J. J., Bailey, J. A., Rogier, E., Cunningham, J., Aydemir, O., & Parr, J. B. (2021). *Plasmodium falciparum* is evolving to escape malaria rapid diagnostic tests in Ethiopia. Nature microbiology, 6(10), 1289–1299. https://doi.org/10.1038/s41564-021-00962-4

Figueroa-Ildefonso, E. (2023). Identificación de huellas de selección en Plasmodium falciparum de la Amazonía Peruana. (Tesis de maestría, Universidad Peruana Cayetano Heredia). Repositorio Institucional UPCH.

Fontaine, M. C., Pease, J. B., Steele, A., Waterhouse, R. M., Neafsey, D. E., Sharakhov, I. V., Jiang, X., Hall, A. B., Catteruccia, F., Kakani, E., Mitchell, S. N., Wu, Y. C., Smith, H. A., Love, R. R., Lawniczak, M. K., Slotman, M. A., Emrich, S. J., Hahn, M. W., & Besansky, N. J. (2015). Mosquito genomics. Extensive introgression in a malaria vector species complex revealed by phylogenomics. Science (New York, N.Y.), 347(6217), 1258524. https://doi.org/10.1126/science.1258524

Frischknecht, F., & Matuschewski, K. (2017). *Plasmodium* Sporozoite Biology. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 7(5), a025478. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025478

Gamboa, D., Ho, M. F., Bendezu, J., Torres, K., Chiodini, P. L., Barnwell, J. W., Incardona, S., Perkins, M., Bell, D., McCarthy, J., & Cheng, Q. (2010). A large proportion of *P. falciparum* isolates in the Amazon region of Peru lack *pfhrp2* and *pfhrp3*: implications for malaria rapid diagnostic tests. PloS one, 5(1), e8091. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008091

Gendrot, M., Madamet, M., Fonta, I., Benoit, N., Amalvict, R., Mosnier, J., French National Reference Centre for Imported Malaria Study Group, & Pradines, B. (2022). Comparative Assessment of the Sensitivity of Ten Commercial Rapid Diagnostic Test Kits for the Detection of Plasmodium. Diagnostics, 12(9), 2240. https://doi.org/10.3390/diagnostics12092240

Gerald, N., Mahajan, B., & Kumar, S. (2011). Mitosis in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Eukaryotic cell, 10(4), 474–482. https://doi.org/10.1128/EC.00314-10

Región Regional de Loreto (GRL). (2024). Plan Hacia la Eliminación de la Malaria 2022–2030. Periodo 2024: GERESA Loreto [Documento técnico]. Gobierno Regional Loreto. Aprobado mediante Resolución Ejecutiva Regional N.° 359-2024-GRL-GR. https://www.gob.pe/institucion/regionloreto/informes-publicaciones/5796572-plan-hacia-la-eliminacion-de-la-malaria-2022-2030-periodo-2024-geresa-loreto

Góes, L., Chamma-Siqueira, N., Peres, J. M., Nascimento, J. M., Valle, S., Arcanjo, A. R., Lacerda, M., Blume, L., Póvoa, M., & Viana, G. (2020). Evaluation of Histidine-Rich Proteins 2 and 3 Gene Deletions in *Plasmodium falciparum* in Endemic Areas of the Brazilian Amazon. International journal of environmental research and public health, 18(1), 123. https://doi.org/10.3390/ijerph18010123

Golassa, L., Messele, A., Amambua-Ngwa, A., & Swedberg, G. (2020). High prevalence and extended deletions in *Plasmodium falciparum hrp2/3* genomic loci in Ethiopia. PloS one, 15(11), e0241807. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241807

Grignard, L., Nolder, D., Sepúlveda, N., Berhane, A., Mihreteab, S., Kaaya, R., Phelan, J., Moser, K., van Schalkwyk, D. A., Campino, S., Parr, J. B., Juliano, J. J., Chiodini, P., Cunningham, J., Sutherland, C. J., Drakeley, C., & Beshir, K. B. (2020). A novel multiplex qPCR assay for detection of *Plasmodium falciparum* with histidine-rich protein 2 and 3 (*pfhrp2* and *pfhrp3*) deletions in polyclonal infections. EBioMedicine, 55, 102757. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102757

Hasan, D. (2021). What is the relationship between the Tm of primers and annealing temperature? ResearchGate. https://www.researchgate.net/post/What_is_the_relationship_between_the_Tm_of_primers_and_annealing_temperature/5fff083a97c4cf7355090162/citation/download

Houzé, S., Hubert, V., Le Pessec, G., Le Bras, J., & Clain, J. (2011). Combined deletions of *pfhrp2* and *pfhrp3* genes result in *Plasmodium falciparum* malaria false-negative rapid diagnostic test. Journal of clinical microbiology, 49(7), 2694–2696. https://doi.org/10.1128/JCM.00281-11

Joice, R., Nilsson, S. K., Montgomery, J., Dankwa, S., Egan, E., Morahan, B., Seydel, K. B., Bertuccini, L., Alano, P., Williamson, K. C., Duraisingh, M. T., Taylor, T. E., Milner, D. A., & Marti, M. (2014). *Plasmodium falciparum* transmission stages accumulate in the human bone marrow. Science translational medicine, 6(244), 244re5. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008882

Kaaya, R. D., Amour, C., Matowo, J. J., Mosha, F. W., Kavishe, R. A., & Beshir, K. B. (2022). Genetic Sequence Variation in the *Plasmodium falciparum* Histidine-Rich Protein 2 Gene from Field Isolates in Tanzania: Impact on Malaria Rapid Diagnosis. Genes, 13(9), 1642. https://doi.org/10.3390/genes13091642

Kattenberg, J. H., Fernandez-Miñope, C., van Dijk, N. J., Llacsahuanga Allcca, L., Guetens, P., Valdivia, H. O., Van Geertruyden, J. P., Rovira-Vallbona, E., Monsieurs, P., Delgado-Ratto, C., Gamboa, D., & Rosanas-Urgell, A. (2023).

Malaria Molecular Surveillance in the Peruvian Amazon with a Novel Highly Multiplexed Plasmodium falciparum AmpliSeq Assay. Microbiology spectrum, 11(2), e0096022. Advance online publication. https://doi.org/10.1128/spectrum.00960-22

Kojom, L. P., & Singh, V. (2020). Prevalence of *Plasmodium falciparum* field isolates with deletions in histidine-rich protein 2 and 3 genes in context with sub-Saharan Africa and India: a systematic review and meta-analysis. Malaria journal, 19(1), 46. https://doi.org/10.1186/s12936-019-3090-6

Košir, A. B., Divieto, C., Pavšič, J., Pavarelli, S., Dobnik, D., Dreo, T., Bellotti, R., Sassi, M. P., & Žel, J. (2017). Droplet volume variability as a critical factor for accuracy of absolute quantification using droplet digital PCR. Analytical and bioanalytical chemistry, 409(28), 6689–6697. https://doi.org/10.1007/s00216-017-0625-y

Kumar, R., Verma, A. K., Shrivas, S., Thota, P., Singh, M. P., Rajasubramaniam, S., Das, A., & Bharti, P. K. (2020). First successful field evaluation of new, one-minute haemozoin-based malaria diagnostic device. EClinicalMedicine, 22, 100347. https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2020.100347

Landis, J. R., & Koch, G. G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics, 33(1), 159–174. https://www.jstor.org/stable/2529310?origin=crossref

Malaria Cero. (2017). Resolución Ministerial Nº 244-2017/MINSA: Aprueban el Documento Técnico “Plan Malaria Cero Período 2017-2021” [Resolución]. Diario Oficial El Peruano. https://busquedas.elperuano.pe/dispositivo/NL/1508319-2

MalariaGEN, Abdel Hamid, M. M., Abdelraheem, M. H., Acheampong, D. O., Ahouidi, A., Ali, M., Almagro-Garcia, J., Amambua-Ngwa, A., Amaratunga, C., Amenga-Etego, L., Andagalu, B., Anderson, T., Andrianaranjaka, V., Aniebo, I., Aninagyei, E., Ansah, F., Ansah, P. O., Apinjoh, T., Arnaldo, P., Ashley, E., … van der Pluijm, R. W. (2023). Pf7: an open dataset of *Plasmodium falciparum* genome variation in 20,000 worldwide samples. Wellcome open research, 8, 22. https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.18681.1

Maltha, J., Gamboa, D., Bendezu, J., Sanchez, L., Cnops, L., Gillet, P., & Jacobs, J. (2012). Rapid diagnostic tests for malaria diagnosis in the Peruvian Amazon: impact of *pfhrp2* gene deletions and cross-reactions. PloS one, 7(8), e43094. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043094

McCaffery, J. N., Nace, D., Herman, C., Singh, B., Sompwe, E. M., Nkoli, P. M., Ngoyi, D. M., Kahunu, G. M., Halsey, E. S., & Rogier, E. (2021). *Plasmodium falciparum pfhrp2* and *pfhrp3* gene deletions among patients in the DRC enrolled from 2017 to 2018. Scientific reports, 11(1), 22979. https://doi.org/10.1038/s41598-021-02452-3

Mihreteab, S., Anderson, K., Pasay, C., Smith, D., Gatton, M. L., Cunningham, J., Berhane, A., & Cheng, Q. (2021). Epidemiology of mutant *Plasmodium falciparum* parasites lacking histidine-rich protein 2/3 genes in Eritrea 2 years after switching from HRP2-based RDTs. Scientific reports, 11(1), 21082. https://doi.org/10.1038/s41598-021-00714-8

Ministerio de Salud (MINSA). Norma técnica de salud para la atención de la malaria y malaria grave en el Perú. (2007) https://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/2949.pdf

Ministerio de Salud (MINSA). Plan hacia la eliminación de la malaria en el Perú 2022 - 2030. (2022). https://www.dge.gob.pe/portal/docs/tools/teleconferencia/2022/SE082022/01.pdf

Ministerio de Salud (MINSA). Plan Malaria Cero 2017 - 2021. (2017). https://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/04/965065/rm_244-2017-minsa.pdf

Ministerio de Salud (MINSA). Número de casos de malaria, Perú 2020 – 2024. (2024). https://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/sala/2024/SE43/malaria.pdf

Ministerio de Salud (MINSA). Número de casos de malaria, Perú 2020 – 2023. (2023). https://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/sala/2023/SE23/malaria.pdf

Minitab. (2022). ¿Qué son los errores https://support.minitab.com/es-mx/minitab/help-and-how-to/statistics/basic-statistics/supporting-topics/basics/type-i-and-type-ii-error/

Montenegro, C. C., Bustamante-Chauca, T. P., Pajuelo Reyes, C., Bernal, M., Gonzales, L., Tapia-Limonchi, R., Tejedo, J. R., & Chenet, S. M. (2021). *Plasmodium falciparum* outbreak in native communities of Condorcanqui, Amazonas, Perú. Malaria journal, 20(1), 88. https://doi.org/10.1186/s12936-021-03608-2

Murillo Solano, C., Akinyi Okoth, S., Abdallah, J. F., Pava, Z., Dorado, E., Incardona, S., Huber, C. S., Macedo de Oliveira, A., Bell, D., Udhayakumar, V., & Barnwell, J. W. (2015). Deletion of *Plasmodium falciparum* Histidine-Rich Protein 2 (*pfhrp2*) and Histidine-Rich Protein 3 (*pfhrp3*) Genes in Colombian Parasites. PloS one, 10(7), e0131576. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131576

Murray, C. K., Gasser, R. A., Jr, Magill, A. J., & Miller, R. S. (2008). Update on rapid diagnostic testing for malaria. Clinical microbiology reviews, 21(1), 97–110. https://doi.org/10.1128/CMR.00035-07

Nateghpour, M., Edrissian, G., Raeisi, A., Motevalli-Haghi, A., Farivar, L., Mohseni, G., & Rahimi-Froushani, A. (2012). The Role of Malaria Microscopy Training and Refresher Training Courses in Malaria Control Program in Iran during 2001 - 2011. Iranian journal of parasitology, 7(4), 104–109.

National Center for Biotechnology Information. (NCBI). (2004). Deletion Mutation (Concept ID: C1511760). MedGen. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/medgen/268339

Nolan, T., Huggett, J., & Sanchez, E. (2013). Good practice guide for the application of quantitative PCR (qPCR). LGC. https://www.gene-quantification.de/national-measurement-system-qpcr-guide.pdf

Omega Bio-tek. (s.f.). E.Z.N.A.® Blood DNA Mini Kit. https://omegabiotek.com/product/e-z-n-a-blood-dna-mini-kit/

Organización Panamericana de la Salud. (OPS). (2021). Guía de acción multisectorial para poner fin a la malaria. https://www.paho.org/sites/default/files/2021-10/2021-cde-multisectoral-action-guide-malaria-es.pdf

Organización Panamericana de la Salud. (OPS). (2024). Malaria (paludismo): síntomas, prevención y tratamientos. https://www.paho.org/es/temas/malaria

Organismo Andino de Salud – Convenio Hipólito Unanue (ORAS-CONHU). (2009). PAMAFRO, Juntos contra la malaria. https://www.orasconhu.org/documentos/01%20-%20LIBRO%20LECCIONES%20APRENDIDAS%20FINAL%202009%20-3.pdf

Pardavé Lugo, B., Arce Barboza, C., & Gutierrez Gonzales, S. (1997). Manual de procedimientos técnicos para el diagnóstico de malaria (2ª ed.). Instituto Nacional de Salud, Ministerio de Salud del Perú. https://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/5666.pdf

Pava, Z., Echeverry, D. F., Díaz, G., & Murillo, C. (2010). Large variation in detection of histidine-rich protein 2 in *Plasmodium falciparum* isolates from Colombia. The American journal of tropical medicine and hygiene, 83(4), 834–837. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.10-0075

Perkins S. L. (2014). Malaria's many mates: past, present, and future of the systematics of the order Haemosporida. The Journal of parasitology, 100(1), 11–25. https://doi.org/10.1645/13-362.1

Phillips, M., Burrows, J., Manyando, C. et al. Malaria. Nat Rev Dis Primers 3, 17050 (2017). https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.50

Poder Judicial del Perú. (PJP). (2024). Corte de Loreto llevará servicios públicos a pueblos indígenas. https://www.pj.gob.pe/wps/wcm/connect/corte%2Bsuperior%2Bloreto%2Bpj/s_csj_loreto_nuevo/as_inicio/as_imagen_prensa/as_noticias/csjlo_n_corte_de_loreto_llevara_servicios_publicos_a_pueblos_indigenas

Poti KE, Sullivan DJ, Dondorp AM, Woodrow CJ. HRP2: Transforming Malaria Diagnosis, but with Caveats. Trends Parasitol. 2020 Feb;36(2):112-126. doi: 10.1016/j.pt.2019.12.004. Epub 2019 Dec 14. PMID: 31848119.

Prudêncio, M., Rodriguez, A., & Mota, M. M. (2006). The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. Nature reviews. Microbiology, 4(11), 849–856. https://doi.org/10.1038/nrmicro1529

Pruvot, M., Kamyingkird, K., Desquesnes, M., Sarataphan, N., & Jittapalapong, S. (2013). The effect of the DNA preparation method on the sensitivity of PCR for the detection of *Trypanosoma* evansi in rodents and implications for epidemiological surveillance efforts. Veterinary parasitology, 191(3-4), 203–208. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.09.010

QIAGEN. (2021). QIAquick PCR purification kit. QIAGEN. https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/dna-clean-up/qiaquick-pcr-purification-kit

QuantaBio. (2020). AccuStart II Taq DNA Polymerase. https://www.quantabio.com/product/accustart-ii-taq-dna-polymerase/

Quispe Carbajal, M. (2017). Análisis de la diversidad genética y estructura genética poblacional de *Plasmodium falciparum* con deleciones en los genes *PFHRP2* y *PFHRP3* en tres comunidades de la Amazonía Peruana. (Tesis de maestría, Universidad Peruana Cayetano Heredia). Repositorio Institucional UPCH.

Rachid Viana, G. M., Akinyi Okoth, S., Silva-Flannery, L., Lima Barbosa, D. R., Macedo de Oliveira, A., Goldman, I. F., Morton, L. C., Huber, C., Anez, A., Dantas Machado, R. L., Aranha Camargo, L. M., Costa Negreiros do Valle, S., Marins Póvoa, M., Udhayakumar, V., & Barnwell, J. W. (2017). Histidine-rich protein 2 (*pfhrp2*) and *pfhrp3* gene deletions in *Plasmodium falciparum* isolates from select sites in Brazil and Bolivia. PloS one, 12(3), e0171150. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171150

Rogier, E., McCaffery, J. N., Mohamed, M. A., Herman, C., Nace, D., Daniels, R., Lucchi, N., Jones, S., Goldman, I., Aidoo, M., Cheng, Q., Kemenang, E. A., Udhayakumar, V., & Cunningham, J. (2022). *Plasmodium falciparum pfhrp2* and *pfhrp3* Gene Deletions and Relatedness to Other Global Isolates, Djibouti, 2019-2020. Emerging infectious diseases, 28(10), 2043–2050. https://doi.org/10.3201/eid2810.220695

Rougemont, M., Van Saanen, M., Sahli, R., Hinrikson, H. P., Bille, J., & Jaton, K. (2004). Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by *18S rRNA* gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. Journal of clinical microbiology, 42(12), 5636–5643. https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5636-5643.2004

Rougeron, V., Boundenga, L., Arnathau, C., Durand, P., Renaud, F., & Prugnolle, F. (2022). A population genetic perspective on the origin, spread and adaptation of the human malaria agents *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. FEMS microbiology reviews, 46(1), fuab047. https://doi.org/10.1093/femsre/fuab047

Saavedra-Samillán, M., Burgos, F., García Huamán, F., Valdivia, H. O., Gamboa, D., & Chenet, S. M. (2024). Spatiotemporal dynamics of malaria and climate influence on its incidence in Condorcanqui Province, 2005-2022. Malaria journal, 23(1), 380. https://doi.org/10.1186/s12936-024-05193-6

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, 13 Suppl 1, 497. https://doi.org/10.1186/s12936-015-1019-2

Sato S. (2021). *Plasmodium*-a brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology. Journal of physiological anthropology, 40(1), 1. https://doi.org/10.1186/s40101-020-00251-9

Scherf, A., & Mattei, D. (1992). Cloning and characterization of chromosome breakpoints of *Plasmodium falciparum*: breakage and new telomere formation occurs frequently and randomly in subtelomeric genes. Nucleic acids research, 20(7), 1491–1496. https://doi.org/10.1093/nar/20.7.1491

Schindler, T., Deal, A. C., Fink, M., Guirou, E., Moser, K. A., Mwakasungula, S. M., Mihayo, M. G., Jongo, S. A., Chaki, P. P., Abdulla, S., Valverde, P. C. M., Torres, K., Bijeri, J. R., Silva, J. C., Hoffman, S. L., Gamboa, D., Tanner, M., & Daubenberger, C. (2019). A multiplex qPCR approach for detection of *pfhrp2* and *pfhrp3* gene deletions in multiple strain infections of *Plasmodium falciparum*. Scientific reports, 9(1), 13107. https://doi.org/10.1038/s41598-019-49389-2

Sehn, J. K. (2015). Insertions and deletions (indels). En M. J. B. Arno & J. M. B. Arno (Eds.), Clinical Genomics (pp. 129–150). Elsevier. https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/slipped-strand-mispairing

Siciliano, G., Costa, G., Suárez-Cortés, P., Valleriani, A., Alano, P., & Levashina, E. A. (2020). Critical Steps of *Plasmodium falciparum* Ookinete Maturation. Frontiers in microbiology, 11, 269. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00269

Sima-Biyang, Y. V., Ontoua, S. S., Longo-Pendy, N. M., Mbou-Boutambe, C., Makouloutou-Nzassi, P., Moussadji, C. K., Lekana-Douki, J. B., & Boundenga, L. (2024). Epidemiology of malaria in Gabon: A systematic review and meta-analysis from 1980 to 2023. Journal of infection and public health, 17(7), 102459. https://doi.org/10.1016/j.jiph.2024.05.047

Sinden, R. E., & Hartley, R. H. (1985). Identification of the meiotic division of malarial parasites. The Journal of protozoology, 32(4), 742–744. https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1985.tb03113.x

Singh, A., Singh, M. P., Bhandari, S., Rajvanshi, H., Nisar, S., Telasey, V., Jayswar, H., Mishra, A. K., Das, A., Kaur, H., Lal, A. A., & Bharti, P. K. (2022). Significance of nested PCR testing for the detection of low-density malaria infection amongst febrile patients from the Malaria Elimination Demonstration Project in Mandla, Madhya Pradesh, India. Malaria journal, 21(1), 341. https://doi.org/10.1186/s12936-022-04355-8

Smith, R. C., & Jacobs-Lorena, M. (2010). *Plasmodium*-Mosquito Interactions: A Tale of Roadblocks and Detours. Advances in insect physiology, 39, 119–149. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381387-9.00004-X

Sturm, A., Amino, R., van de Sand, C., Regen, T., Retzlaff, S., Rennenberg, A., Krueger, A., Pollok, J. M., Menard, R., & Heussler, V. T. (2006). Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. Science (New York, N.Y.), 313(5791), 1287–1290. https://doi.org/10.1126/science.1129720

Sullivan, D. J., Jr, Ayala, Y. M., & Goldberg, D. E. (1996). An unexpected 5' untranslated intron in the *P. falciparum* genes for histidine-rich proteins II and III. Molecular and biochemical parasitology, 83(2), 247–251. https://doi.org/10.1016/s0166-6851(96)02768-5

Thermo Fisher Scientific. (n.d.). *BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit*. https://www.thermofisher.com/pe/en/home/life-science/sequencing/sanger-sequencing/sanger-sequencing-kits-reagents/bigdye-terminator-cycle-sequencing-kit.html

Valdivia, H. O., Anderson, K., Smith, D., Pasay, C., Salas, C. J., Braga, G., Lucas, C. M., Lizewski, S. E., Joya, C. A., Kooken, J. M., Sanchez, J. F., & Cheng, Q. (2022). Spatiotemporal dynamics of Plasmodium falciparum histidine-rich protein 2 and 3 deletions in Peru. Scientific reports, 12(1), 19845. https://doi.org/10.1038/s41598-022-23881-8

Vera-Arias, C. A., Holzschuh, A., Oduma, C. O., Badu, K., Abdul-Hakim, M., Yukich, J., ... & Koepfli, C. (2021). *Plasmodium falciparum hrp2* and *hrp3* gene deletion status in Africa and South America by highly sensitive and specific digital PCR. medRxiv, 2021-06. https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.06.01.21258117v1

Walker-Jonah, A., Dolan, S. A., Gwadz, R. W., Panton, L. J., & Wellems, T. E. (1992). An RFLP map of the *Plasmodium falciparum* genome, recombination rates and favored linkage groups in a genetic cross. Molecular and biochemical parasitology, 51(2), 313–320. https://doi.org/10.1016/0166-6851(92)90081-t

Wellems, T. E., Walliker, D., Smith, C. L., do Rosario, V. E., Maloy, W. L., Howard, R. J., Carter, R., & McCutchan, T. F. (1987). A histidine-rich protein gene marks a linkage group favored strongly in a genetic cross of *Plasmodium falciparum*. Cell, 49(5), 633–642. https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90539-3

World Health Organization (WHO). (2023). Update of the response plan to pfhrp2 gene deletions: Meeting report, Geneva, Switzerland, 11–12 January 2023. World Health Organization. https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/379635/B09146-eng.pdf?sequence=1

World Health Organization (WHO). (2010). Guidelines for the Treatment of Malaria. 2nd ed. Geneva: World Health Organization; PMID: 25473692.

World Health Organization (WHO). Malaria (2024a). https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria

World Health Organization (WHO). World Malaria Report: addressing inequity in the global malaria response (2024b). https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2024

World Health Organization (WHO). Master Protocol for surveillance of *pfhrp2/3* deletions and biobanking to support future research (2024c)

World Health Organization (WHO). Países y territorios que han recibido la certificación de eliminación del paludismo. https://www.who.int/es/teams/global-malaria-programme/elimination/countries-and-territories-certified-malaria-free-by-who

Worldwide Antimalarial Resistance Network (WWARN) AL Dose Impact Study Group (2015). The effect of dose on the antimalarial efficacy of artemether-lumefantrine: a systematic review and pooled analysis of individual patient data. The Lancet. Infectious diseases, 15(6), 692–702. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)70024-1

Wurtz, N., Fall, B., Bui, K., Pascual, A., Fall, M., Camara, C., Diatta, B., Fall, K. B., Mbaye, P. S., Diémé, Y., Bercion, R., Wade, B., Briolant, S., & Pradines, B. (2013). *Pfhrp2* and *pfhrp3* polymorphisms in *Plasmodium falciparum* isolates from Dakar, Senegal: impact on rapid malaria diagnostic tests. Malaria journal, 12, 34. https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-34

Yabuki, A., Hoshino, T., Nakamura, T., & Mizuno, K. (2024). The copy number of the eukaryotic *rRNA* gene can be counted comprehensively. MicrobiologyOpen, 13(2), e1399. https://doi.org/10.1002/mbo3.1399

X. ANEXOS

Anexo 1. Constancia de aprobación emitida por el Comité Institucional de Ética en Investigación de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

CONSTANCIA-CIEI-397-32-24

El Presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia hace constar que el proyecto de investigación señalado a continuación fue **APROBADO** por el Comité Institucional de Ética en Investigación, bajo la categoría de revisión **EXENTO**. La aprobación será informada en la sesión más próxima del comité.

Título del Proyecto	: **"Caracterización genotípica de las deleciones en los genes pfhrp2 y pfhrp3 en muestras de Plasmodium falciparum del distrito de Río Santiago, Amazonas, Perú"**
Código SIDISI	: **214705**
Investigador(a) principal(es)	: **Gamboa Vilela Dionicia Baziliza**

La **aprobación** incluyó los documentos finales descritos a continuación:

1. **Protocolo de investigación, versión 2.0 de fecha 12 de agosto del 2024**.

La **APROBACIÓN** considera el cumplimiento de los estándares de la Universidad, los lineamientos científicos y éticos, el balance riesgo/beneficio, la calificación del equipo investigador y la confidencialidad de los datos, entre otros.

Cualquier enmienda, desviaciones, eventualidad deberá ser reportada de acuerdo a los plazos y normas establecidas. La categoría de **EXENTO** es otorgado al proyecto por un periodo de cinco años en tanto la categoría se mantenga y no existan cambios o desviaciones al protocolo original. El investigador está exonerado de presentar un reporte del progreso del estudio por el periodo arriba descrito y sólo alcanzará un informe final al término de éste. La aprobación tiene vigencia desde la emisión del presente documento hasta el **Lunes 13 de agosto del 2029**.

El presente proyecto de investigación sólo podrá iniciarse después de haber obtenido la(s) autorización(es) de la(s) institución(es) donde se ejecutará.

Si aplica, los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Lima, 13 de agosto del 2024

COMITÉ INSTITUCIONAL DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
Universidad Peruana Cayetano Heredia
CIEI

Manuel Raul Perez Martinot
Presidente
Comité Institucional de Ética en Investigación
Universidad Peruana Cayetano Heredia

Anexo 2. Coordenadas geográficas de las comunidades ubicadas en las regiones de Amazonas y Loreto

Región	Distrito	Comunidad	Coordenadas
Amazonas	Río Santiago (n = 50)	Ayambis	3° 38' 23.1" S, 77° 46' 07.8" W
		Chapiza	3° 43' 29.8" S, 77° 42' 19.3" W
		Nauta	3° 40' 51.2" S, 77° 45' 30.7" W
		Alianza Progreso	3° 43' 45.7" S, 77° 45' 27.0" W
		Soledad	3° 30' 51.5" S, 77° 46' 01.6" W
		Nazareth	5° 08' 16.0" S, 78° 19' 15.8" W
		La Isla	4° 17' 08.8" S, 77° 44' 36.7" W
		Pachis	3° 21' 07.3" S, 77° 52' 42.3" W
		Cucuasa	3° 20' 26.4" S, 77° 52' 40.0" W
		Pampa Entsa	3° 50' 04.9" S, 77° 44' 31.9" W
		Nueva Esperanza	3° 47' 07.0" S, 77° 44' 05.4" W
Loreto	Andoas (n = 35)	Washientza	3° 20' 4" S, 76° 34' 18" W
		Limoncocha	3° 43' 40" S, 76° 45' 35" W
		Puerto Pijuayal	3° 55' 10" S, 76° 43' 57" W
		Huagramona	3° 4' 38" S, 76° 26' 21" W
		Nuevo Andoas	2° 48' 26" S, 76° 27' 28" W
	Trompeteros (n = 57)	Nueva Jerusalén	2° 50' 12.4"S, 76° 11' 29.8"W

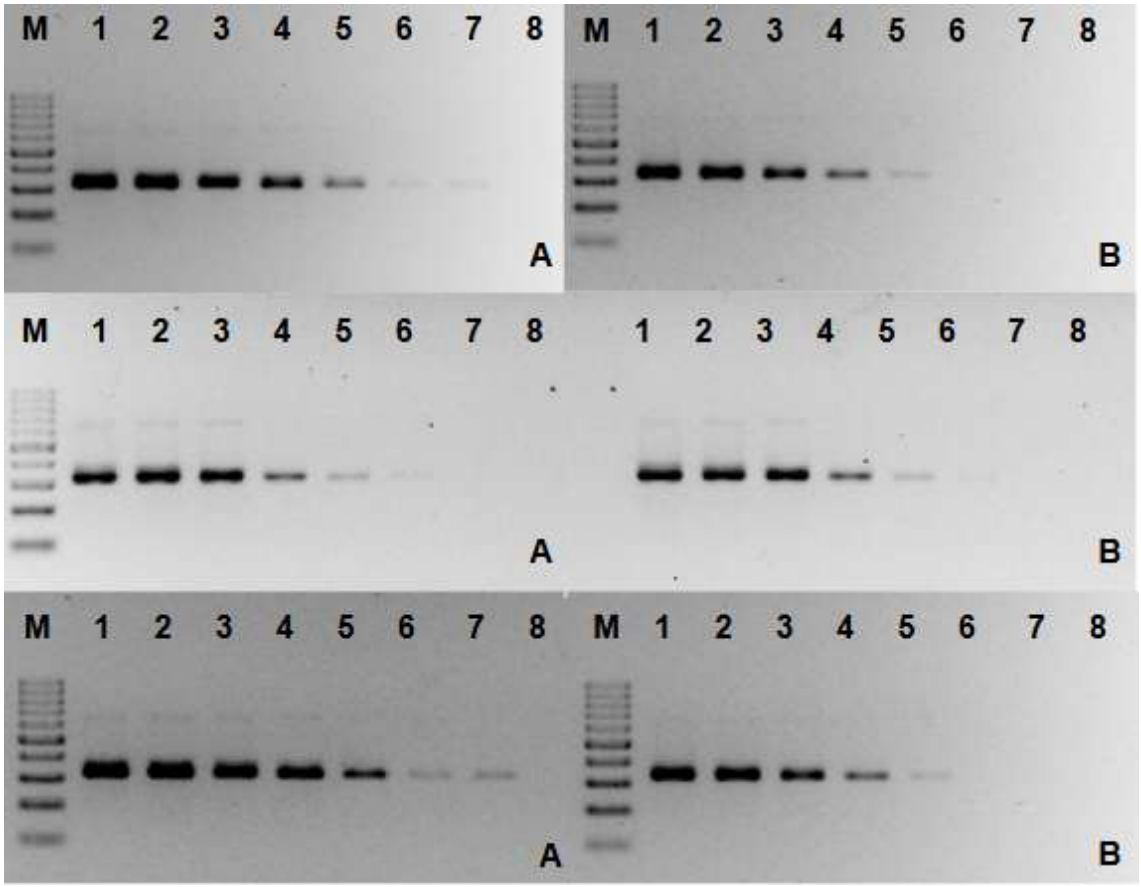
Anexo 3. Resultados del BLASTn correspondientes al alineamiento de los *primers* del exón 1 del gen *pfhrp2* contra el genoma de la cepa Dd2.

Secuencia *Forward*					
Código de accesión	**Resultado máximo**	**Resultado total**	**Cobertura (%)**	***E-value***	**Porcentaje de identidad (%)**
AM411439.1	16.4	116	96	0.3	100.00
Secuencia *Reverse*					
Código de accesión	**Resultado máximo**	**Resultado total**	**Cobertura (%)**	***E-value***	**Porcentaje de identidad (%)**
AM411439.1	20.3	67.4	95	0.017	100.00

Anexo 4. Secuencias de los *primers* utilizados para amplificar el exón 2 de los genes *pfhrp2/3*, junto con sus regiones flanqueantes.

Región	**Marcador**	**Primer**	**Secuencia (5´- 3´)**
Exón 2	***pfhrp2***	*Forward*	GAT TAT TAC ACG AAA CTC AAG C
		Reverse	AAT AAA TTT AAT GGC GTA GGC
	pfhrp3	*Forward*	AAA TAA GAG ATT ATT ACA CGA AAG
		Reverse	TGG TGT AAG TGA TGC GTA GT
Regiones flanqueantes	**PF3D7_081900**	*Forward*	TAT GAA CGC AAT TTA AGT GAG GCA G
		Reverse	TAT CCA ATC CTT CCT TTG CAA CAC C
	PF3D7_081700	*Forward*	AGA CAA GCT ACC AAA GAT GCA GGT G
		Reverse	TAA ATG TGT ATC TCC TGA GGT AGC
	PF3D7_1372400	*Forward*	TTG AGT GCA ATG ATG AGT GGA G
		Reverse	AAA TCA TTT CCT TTT ACA CTA GTG C
	PF3D7_1372100	*Forward*	TTC ATG AGT AGA TGT CCT AGG AG
		Reverse	TCG TAC AAT TCA TCA TAC TCA CC

Anexo 5. Repeticiones (3) de la sensibilidad de detección del gen pfhrp2 (exón 1) mediante PCR convencional.



A) Uso de la cepa 3d7. **1**: $5.9\ x\ 10^5$, **2**: $5.9\ x\ 10^4$, **3**: $5.9\ x\ 10^3$, **4**: $5.9\ x\ 10^2$, **5**: $5.9\ x\ 10^1$, **6**: $5.9\ x\ 10^0$, **7**: $2.9\ x\ 10^0$, **8**: $1.5\ x\ 10^0$. **B)** Uso de la cepa HB3. **1**: $6.1\ x\ 10^4$, **2**: $6.1\ x\ 10^3$, **3**: $6.1\ x\ 10^2$, **4**: $6.1\ x\ 10^1$, **5**: $6.1\ x\ 10^0$, **6**: $3.1\ x\ 10^0$, **7**: $1.5\ x\ 10^0$, **8**: $0.8\ x\ 10^0$. **M**: Marcador de 100 pb.