Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

Identificación de *Plasmodium spp.* en primates no humanos mantenidos en semicautiverio en las islas Iquitos, Muyuy y Padre Isla, de la Cuenca Amazónica Peruana

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

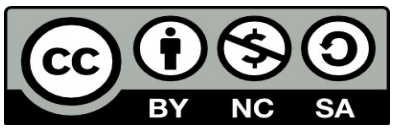
Jhonathan Arturo BAZALAR GONZALES

ASESOR

Dr. Abelardo Lenín MATURRANO HERNÁNDEZ

Lima, Perú

2023



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

Bazalar J. Identificación de *Plasmodium spp.* en primates no humanos mantenidos en semicautiverio en las islas Iquitos, Muyuy y Padre Isla, de la Cuenca Amazónica Peruana [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2023.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Jhonathan Arturo Bazalar Gonzales
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	45165351
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-3725-1634
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Abelardo Lenín Maturrano Hernández
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	15725076
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-8819-7335
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Amanda Cristina Chávez Velásquez
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07801682
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Luis Antonio Gómez Puerta
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	10810335
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Miryam Jeanette Quevedo Urday
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	40064320

Datos de investigación	
Línea de investigación	A.1.3.1. Salud Pública B.1.4.2. Enfermedades transmitidas por vectores B.4.1.5. Microbiología y Parasitología Veterinaria B.4.1.9. Patología clínica y biología molecular B.4.4.1. Medicina Veterinaria preventiva
Grupo de investigación	Biotecnología aplicada a la conservación, sanidad y producción animal – SANIGEN
Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. R.R. Nº 03556-R-19. Código de proyecto A19081091
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Estación Biológica de la Isla Muyuy. Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura – Iquitos. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. País: Perú Departamento: Loreto Provincia: Maynas Distrito: Fernando Lores Latitud: -3.862375375031175 Longitud: -73.19190470198737 Edificio: Estación Biológica de Padre Isla. Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura – Iquitos. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. País: Perú Departamento: Loreto Provincia: Maynas Distrito: Belén Centro poblado: Padre Isla Latitud: -3.685636799243024 Longitud: -73.180904700296

	Edificio: Laboratorio de Microbiología. Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura – Iquitos. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. País: Perú Departamento: Loreto Provincia: Maynas Distrito: San Juan Bautista Calle: Av. Guardia Republicana 85 Latitud: -3.7715567900052167 Longitud: -73.27418384314748 Edificio: Laboratorio de Biología y Genética Molecular. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: San Borja Calle: Av. Circunvalación 2800 Latitud: -12.081202380563496 Longitud: -76.98825552784876
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Julio 2021 – febrero 2023
URL de disciplinas OCDE	Medicina tropical https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.03.06 Parasitología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.03.07 Ciencia veterinaria https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.01

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú, Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el Auditorio Principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día **lunes 17 de julio de 2023**, a las **12:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral **Nº 0129-EPMV/FMV-2023**, integrado por los siguientes profesores:

MV. Dra. Chávez Velásquez, Amanda Cristina	**Presidente del Jurado**
Blgo. Dr. Maturrano Hernández, Abelardo Lenín	**Asesor de la Tesis**
MV. Mg. Gómez Puerta, Luis Antonio	**Miembro del Jurado**
MV. Mg. Quevedo Urday, Miryam Jeanette	**Miembro del Jurado**

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, el Bachiller Don: **JHONATHAN ARTURO BAZALAR GONZALES** para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

"IDENTIFICACIÓN DE Plasmodium spp. EN PRIMATES NO HUMANOS MANTENIDOS EN SEMICAUTIVERIO EN LAS ISLAS IQUITOS, MUYUY Y PADRE ISLA, DE LA CUENCA AMAZÓNICA PERUANA"

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECIOCHO (18).**

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las 13:00 horas, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:

UNMSM Firmado digitalmente por CHAVEZ VELASQUEZ DE GARCIA Amanda Cristina FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 19.07.2023 15:21:35 -05:00

……
Chávez Velásquez, Amanda Cristina: MV. Dra. Prof. Principal DE

UNMSM Firmado digitalmente por MATURRANO HERNANDEZ Abelardo Lenin FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 20.07.2023 11:50:23 -05:00

……
Maturrano Hernández, Abelardo Lenin: Blgo. Dr.Prof. Principal DE

UNMSM Firmado digitalmente por GOMEZ PUERTA Luis Antonio FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 20.07.2023 14:18:54 -05:00

……
Gómez Puerta, Luis Antonio: MV. Mg. Prof. Auxiliar TC

UNMSM Firmado digitalmente por QUEVEDO URDAY Miryam Jeanette FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 20.07.2023 20:21:01 -05:00

……
Quevedo Urday, Miryam Jeanette: MV. Mg. Prof. Asociado DE

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA

Facultad de Medicina Veterinaria

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral Nº 0129-EPMV/FMV-2023

UNMSM Firmado digitalmente por CHAVEZ VELASQUEZ DE GARCIA Amanda Cristina FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 19.07.2023 15:21:55 -05:00

PRESIDENTE: ……

CHÁVEZ VELÁSQUEZ, AMANDA CRISTINA

UNMSM Firmado digitalmente por MATURRANO HERNANDEZ Abelardo Lenin FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 20.07.2023 11:51:14 -05:00

MIEMBROS : ……

MATURRANO HERNÁNDEZ, ABELARDO LENÍN
ASESOR DE LA TESIS

UNMSM Firmado digitalmente por GOMEZ PUERTA Luis Antonio FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 20.07.2023 14:19:17 -05:00

: ……

GÓMEZ PUERTA, LUIS ANTONIO

UNMSM Firmado digitalmente por QUEVEDO URDAY Miryam Jeanette FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 20.07.2023 20:20:36 -05:00

: ……

QUEVEDO URDAY, MIRYAM JEANETTE

San Borja, 18 de julio de 2023

Vº Bº

UNMSM Firmado digitalmente por SANTIANI ACOSTA Alexei Vicent FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 24.07.2023 16:03:07 -05:00

……..

Dr. Alexei Vicent Santiani Acosta
Director EPMV
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, **ABELARDO LENIN MATURRANO HERNÁNDEZ**, en mi condición de asesor, acreditado con la Resolución Directoral N° 0175-EPMV/FMV-2021, de la tesis, cuyo título es "**IDENTIFICACIÓN DE *Plasmodium* spp. EN PRIMATES NO HUMANOS MANTENIDOS EN SEMICAUTIVERIO EN LAS ISLAS IQUITOS, MUYUY Y PADRE ISLA, DE LA CUENCA AMAZÓNICA PERUANA**", presentado por el bachiller **JHONATHAN ARTURO BAZALAR GONZALES**, para optar el Título Profesional de **MÉDICO VETERINARIO**, 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 larevisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de **3%** 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 correspondiente.

Firma y sello del Asesor _____

DNI: 15725076

Nombres completos: Abelardo Lenin Maturrano Hernández



Dedicatoria

A mis padres, Arturo y Luz, quienes me brindaron una sólida educación, gracias a ellos me he convertido en quien soy.

A mi hermano Carlos, su esposa Melissa y mi sobrina Catalina, quienes ocupan un lugar especial en mi corazón.

A mi amada Jessica, por apoyarme incondicionalmente y motivarme a seguir adelante.

Al Dr. Raúl Rosadio, por permitirme formar parte de SANIGEN.

Al Dr. Hugo Gálvez, y a los Blgos. Gabriel García y Raúl Bello, por fomentar mi interés por los primates.

A Luis, Dennis, Marcos, Carla, Gaby, Carmen, Thalía y Yenny, con quienes compartí gratos momentos en el Lab.

A quienes sigan contribuyendo a buscar soluciones para erradicar este importante problema de Salud Pública.

Agradecimientos

Al Dr. Lenin Maturrano, por brindarme la oportunidad de realizar esta tesis bajo su asesoría, y a todo el equipo del Laboratorio de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por apoyarme activamente con las actividades propias de esta investigación.

A la Dra. Dionicia Gamboa y al Grupo de Investigación en Malaria del Laboratorio de Malaria de la Facultad de Ciencias e Ingeniería de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por la donación de los controles positivos que fueron empleados en esta investigación.

Al Dr. Carlos Ique (1953-2021), de quien tuve el honor de recibir consejos invaluables que contribuyeron en mi formación profesional y en la elaboración del proyecto de esta investigación, y a todo el personal del Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura-Iquitos, por apoyarme desinteresadamente con las actividades de campo.

Este estudio fue financiado por la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, a través del Vicerrectorado de Investigación y Posgrado, mediante R.R. N° 03556-R-19 y código de proyecto Nro. A19081091.

ÍNDICE

Dedicatoria ii

Agradecimientos iii

RESUMEN vii

ABSTRACT viii

LISTA DE CUADROS ix

LISTA DE FIGURAS x

LISTA DE ANEXOS xi

I. INTRODUCCIÓN 1

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 3

2.1. MALARIA 3

2.1.1. Etiología 3

2.1.1.1. Especies que infectan al hombre 3

2.1.1.1.1. *Plasmodium vivax* (Grassi y Feletti, 1890) 4

2.1.1.1.2. *Plasmodium falciparum* (Welch, 1897) 5

2.1.1.1.3. *Plasmodium malariae* (Feletti y Grassi, 1889) 5

2.1.1.1.4. *Plasmodium ovale* (Stephens, 1922) 5

2.1.1.2. Especies que infectan a PNH 6

2.1.1.2.1. *Plasmodium brasilianum* (Gonder y Von Berenberg-Gossler, 1908) 6

2.1.1.2.2. *Plasmodium simium* (Fonseca, 1951) 6

2.1.2. Ciclo Biológico 6

2.1.2.1. Ciclo esquizogónico 7

2.1.2.2. Ciclo esporogónico 8

2.1.3. Epidemiología 9

2.1.3.1. Situación de la malaria en el Mundo 9

2.1.3.2. Situación de la malaria en América 10

2.1.3.3. Situación de la malaria en Perú 10

2.1.3.4. Efectos de la pandemia de COVID-19 12

2.1.4. Diagnóstico 12

2.1.4.1. Microscopía 12

2.1.4.2. Serología 13
2.1.4.2.1. Inmunocromatografía 13
2.1.4.2.2. ELISA 13
2.1.4.3.Diagnóstico Molecular 14
2.1.4.3.1. PCR anidada 14
2.1.4.3.2. PCR semianidada-múltiple 14
2.1.4.3.3. PCR en tiempo real 14
2.2. PNH COMO RESERVORIOS DE *Plasmodium* spp. 15
2.2.1. Reportes en el Mundo 15
2.2.2. Reportes en América 16
2.2.3. Reportes en el Perú 17
III. MATERIALES Y MÉTODOS 19
3.1. LUGAR DE ESTUDIO 19
3.1.1. Isla Iquitos 20
3.1.2. Isla Muyuy 20
3.1.3. Padre Isla 21
3.2. DESCRIPCIÓN DEL MATERIAL EXPERIMENTAL 22
3.2.1. *Saimiri boliviensis* (Hershkovitz, 1984) 22
3.2.2. *Saguinus labiatus* (É. Geoffroy Saint-Hilaire, 1812) 23
3.2.3. *Saguinus mystax* (Spix, 1823) 24
3.3. MÉTODO 24
3.3.1. Consideraciones Éticas 24
3.3.2. Cálculo del tamaño de la muestra 25
3.3.3. Captura de PNH 26
3.3.3.1. Instalación del campamento base 26
3.3.3.2. Localización de las tropas de PNH 26
3.3.3.3. Colocación de los cebos y acostumbramiento 27
3.3.3.4. Construcción de la trampa y escondite 27
3.3.3.5. Captura propiamente dicha 27
3.3.4. Toma de muestra 28
3.3.4.1. Cálculo del peso y de la dosis del espécimen 28
3.3.4.2. Contención física y química e identificación del sexo 28

3.3.4.3. Toma de muestra de sangre 28
3.3.5. Identificación microscópica 29
3.3.5.1. Elaboración de la Lámina 29
3.3.5.1.1. Gota gruesa 29
3.3.5.1.2. Frotis sanguíneo 29
3.3.5.2. Tinción de la Lámina 29
3.3.5.3. Observación de la Lámina 29
3.3.6. Identificación molecular 30
3.3.6.1. Extracción de ADN de las muestras de sangre de PNH 30
3.3.6.2. Extracción de ADN de las muestras controles 31
3.3.6.3. Estandarización de la PCR semianidada-múltiple 31
3.3.6.3.1. Cálculo de la solución de trabajo 31
3.3.6.3.2. Gradiente de temperatura 32
3.3.6.3.3. Condiciones de electroforesis 33
3.3.6.4. Aplicación de la PCR semianidada-múltiple 34
3.3.6.4.1. Primera Reacción 34
3.3.6.4.2. Segunda Reacción 34
3.3.6.4.3. Electroforesis 34
3.3.7. Análisis de la información 35
3.3.7.1. Cálculo de la frecuencia de animales positivos 35
3.3.7.2. Cálculo del intervalo de confianza 35
IV. RESULTADOS 36
4.1. Identificación Microscópica 36
4.2. Identificación Molecular 37
V. DISCUSIÓN 40
VI. CONCLUSIONES 46
VII. RECOMENDACIONES 47
VIII. LITERATURA CITADA 48
IX. APÉNDICE 59

RESUMEN

La malaria es una enfermedad parasitaria potencialmente mortal, causada por hemoparásitos del género *Plasmodium* y transmitida por mosquitos hembra del género *Anopheles* infectados, que afecta gravemente la salud pública mundial, sobre todo en regiones tropicales como la Amazonía, donde cohabitan humanos y primates no humanos (PNH). Varios autores han reportado que los PNH pueden ser reservorios de *Plasmodium*, incluyendo a las especies que causan malaria humana. El objetivo de este estudio fue identificar *Plasmodium* spp. en PNH mantenidos en semicautiverio en las islas Iquitos, Muyuy y Padre Isla, de la Cuenca Amazónica Peruana, mediante técnicas microscópicas y moleculares. Se colectaron 75 muestras de sangre de *Saimiri boliviensis*, *Saguinus labiatus* y *Saguinus mystax*, mediante muestreo aleatorio estratificado, y se enviaron al Laboratorio de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para su análisis. Se empleó la técnica microscópica descrita en la Norma Técnica del Instituto Nacional de Salud del Perú y una técnica de PCR semianidada-múltiple en base al gen codificante de la subunidad 18S del ARN ribosómico. Se detectó que el 21.33% (16/75) y 69.33% (52/75) de los PNH fueron positivos a *Plasmodium* spp. mediante microscopía y PCR semianidada-múltiple respectivamente. Todas las muestras positivas a microscopía fueron identificadas como *Plasmodium vivax*. Además, mediante la PCR semianidada-múltiple, se identificó que el 17.33% (13/75) fueron positivos a *P. vivax/simium*, 4% (3/75) a *P. falciparum*, 61.33% (46/75) a *P. malariae/brasilianum* y 13.33% (10/75) fueron coinfecciones: 10.67% (8/75) asociadas a *P. vivax/simium* con *P. malariae/brasilianum* y 2.67% (2/75) a *P. falciparum* con *P. malariae/brasilianum*. Los resultados confirman que los PNH de esta región están infectados naturalmente con *P. vivax/simium*, *P. falciparum* y *P. malariae/brasilianum*, y sugieren que podrían estar contribuyendo como reservorios en el ciclo de la malaria en la Amazonía Peruana.

Palabras clave: primates no humanos, *Plasmodium vivax/simium*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae/brasilianum*, PCR semianidada-múltiple, gen 18S del ARNr, Amazonía Peruana

ABSTRACT

Malaria is a potentially deadly parasitic disease caused by hemoparasites *Plasmodium* genus and spread through female infected *Anopheles* mosquitoes that affects severely public health worldwide, especially in tropical regions such as the Amazon, where humans and non-human primates (NHP) coexist. Several authors have reported that NHP may be *Plasmodium* reservoirs, including human malaria parasites. This study aimed to detect *Plasmodium* spp. by microscopic and molecular methods in semi-captive NHP on the Iquitos, Muyuy and Padre islands in the Peruvian Amazon basin. Seventy-five blood samples from *Saimiri boliviensis*, *Saguinus labiatus* and *Saguinus mystax* were collected by stratified random sampling and sent to the Laboratory of Biology and Molecular Genetics of the Faculty of Veterinary Medicine of the Universidad Nacional Mayor de San Marcos for analysis. The microscopic technique described in the Technical Standard of the Instituto Nacional de Salud del Perú and a seminested-multiplex PCR assay based on the 18S ribosomal RNA gene were used. It was detected that 21.33% (16/75) and 69.33% (52/75) of the NHP were positive for *Plasmodium* spp. by microscopy and seminested-multiplex PCR, respectively. All positive samples by microscopy were identified as *Plasmodium vivax*. Additionally, by seminested-multiplex PCR, 17.33% (13/75) were positive for *P. vivax/simium*, 4% (3/75) for *P. falciparum*, 61.33% (46/75) for *P. malariae/brasilianum* and 13.33% (10/75) were coinfections: 10.67% (8/75) associated to *P. vivax/simium* with *P. malariae/brasilianum* and 2.67% (2/75) to *P. falciparum* with *P. malariae/brasilianum*. The results confirm that NHP from this region are naturally infected with *P. vivax/simium*, *P. falciparum* and *P. malariae/brasilianum*, and could be contributing as reservoirs in the malaria cycle in the Peruvian Amazon.

Key words: non-human primates, *Plasmodium vivax/simium*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae/brasilianum*, seminested-multiplex PCR, 18S rRNA gene, Peruvian Amazon

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1: Localización geográfica de la concesión de las islas Iquitos, Muyuy y Padre Isla, Provincia de Maynas, Loreto, Perú 19

Cuadro 2: *Primers* empleados en la PCR semianidada-múltiple..... 32

Cuadro 3: Frecuencia de PNH infectados con *Plasmodium* spp. (*P. vivax*) detectados mediante microscopía (n=75) 36

Cuadro 4: Frecuencia de PNH infectados con *Plasmodium* spp. detectados mediante PCR semianidada-múltiple (n=75) 37

Cuadro 5: Frecuencia de PNH infectados con *P. vivax*/*simium*, *P. falciparum* y *P. malariae*/*brasilianum* detectados mediante PCR semianidada-múltiple (n=75)..... 39

Cuadro 6: Frecuencia de PNH con coinfecciones de *Plasmodium* spp. detectados mediante PCR semianidada-múltiple (n=75)..... 39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Árbol filogenético de *Plasmodium* spp. según su genoma mitocondrial 4

Figura 2: Ciclo biológico de *Plasmodium* spp. 7

Figura 3: Curva epidemiológica de la malaria durante los últimos 10 años..... 11

Figura 4: Mapa de la concesión de la Isla Iquitos 20

Figura 5: Mapa de la concesión de la Isla Muyuy 21

Figura 6: Mapa de la concesión de Padre Isla 22

Figura 7: Ejemplar de *S. boliviensis* 23

Figura 8: Ejemplar de *S. labiatus* 23

Figura 9: Ejemplar de *S. mystax* 24

Figura 10: Estadíos sanguíneos de *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* y *P. ovale*..... 30

Figura 11: Electroforesis en gel de agarosa al 2% de la gradiente de temperatura 33

Figura 12: Estadíos sanguíneos de *P. vivax* observado con microscopio óptico a 100x37

Figura 13: Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de la segunda reacción de la PCR semianidada-múltiple..... 38

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: EPP, materiales y equipos empleados 60

Anexo 2: Resultados del análisis microscópico y molecular de *Plasmodium* spp. en especímenes de *Saimiri boliviensis* de la isla Iquitos 62

Anexo 3: Resultado del análisis microscópico y molecular de *Plasmodium* spp. en especímenes de *Saguinus labiatus* de la isla Muyuy 64

Anexo 4: Resultado del análisis microscópico y molecular de *Plasmodium* spp. en especímenes de *Saguinus mystax* de Padre Isla 66

I. INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad parasitaria potencialmente mortal que afecta seriamente la salud pública a nivel mundial, sobre todo en las regiones tropicales y subtropicales. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que es endémica en más de 80 países, especialmente en países pobres y en vías de desarrollo, y provoca más de 200 millones de casos y 600 mil muertes al año, principalmente en niños menores de cinco años (OMS, 2022). En el Perú, el Centro Nacional de Epidemiología, Control y Prevención de Enfermedades del Ministerio de Salud (CDC-Perú) ha reportado que, en el 2022, la enfermedad ocasionó más de 26 mil casos y seis muertes. La mayoría de los casos ocurrieron en regiones de la Amazonía Peruana, sobre todo en las localidades de los departamentos de Loreto, Amazonas y Junín, siendo Loreto el departamento que históricamente ha presentado el mayor número e incidencia de casos notificados durante los últimos 10 años (CDC-Perú, 2022a, 2022b).

La enfermedad es causada por protozoarios hemoparásitos que pertenecen al género *Plasmodium*, y transmitida a través de la picadura de mosquitos hembra del género *Anopheles* infectados. Existen cuatro especies capaces de infectar naturalmente al hombre: *Plasmodium vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* y *P. ovale*; sin embargo, varios autores han reportado que los Primates No Humanos (PNH) pueden ser reservorios de diversas especies de *Plasmodium*, incluyendo a las especies que causan malaria humana, y que algunas de las especies que infectan a los PNH, como *P. knowlesi* y *P. cynomolgi* en Asia, o *P. simium* y *P. brasilianum* en América, también pueden infectar y causar enfermedad en el hombre. Además, estudios recientes han informado que *P. vivax* y *P. malariae* son morfológica y genéticamente similares a *P. simium* y *P. brasilianum*

respectivamente, lo que dificulta su identificación en regiones donde coexisten estas especies, y a la vez, sugieren que podría existir riesgo potencial de transmisión zoonótica en regiones donde cohabitan humanos y PNH (Antinori *et al*., 2021).

En el Perú se han identificado 42 especies de PNH, clasificados en tres familias y 12 géneros, que habitan en los diferentes estratos de los bosques tropicales de la Amazonía Peruana (Pacheco *et al*., 2021). Sin embargo, los estudios de vigilancia epidemiológica de *Plasmodium* spp. en estos primates son escasos. El presente estudio tuvo como objetivo identificar las especies de *Plasmodium* que infectan a los PNH que viven en condiciones de semicautiverio en las Islas Iquitos, Muyuy y Padre Isla, del departamento de Loreto, en la Cuenca Amazónica Peruana, mediante la técnica microscópica descrita en la Norma Técnica del Instituto Nacional de Salud del Perú y una técnica de PCR semianidada-múltiple en base al gen codificante de la subunidad 18S del ARN ribosómico descrita previamente (Rubio *et al*., 1999), con la finalidad de contribuir al esclarecimiento del rol que cumplen estos primates en la dinámica del ciclo de la malaria en la Amazonía Peruana.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. MALARIA

2.1.1. Etiología

La malaria es causada por microorganismos eucariotas unicelulares y ameboides que se comportan como hemoparásitos, y que están clasificados taxonómicamente, en base a sus características morfológicas y moleculares, dentro del phylum Apicomplexa, orden Haemosporida, familia Plasmodiidae y género *Plasmodium*. Actualmente, se han identificado 16 subgéneros y más de 200 especies que son capaces de infectar y causar enfermedad en diferentes tipos de hospederos vertebrados, como los reptiles, aves y mamíferos, entre los que se incluyen al hombre y los PNH (Liu y Tang, 2013).

2.1.1.1. Especies que infectan al hombre

Existen cuatro especies que tienen la capacidad de infectar naturalmente al hombre y son los principales causantes de la malaria en humanos (Ramasamy, 2014). De acuerdo con Escalante *et al*. (2022), se distribuyen filogenéticamente, en base a su genoma mitocondrial, dentro de dos subgéneros, el subgénero *Plasmodium*, que agrupa a las tres especies menos patógenas: *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*; y el subgénero *Laverania*, que incluye a *P. falciparum*, considerada como la especie más patógena de todas (Figura 1).

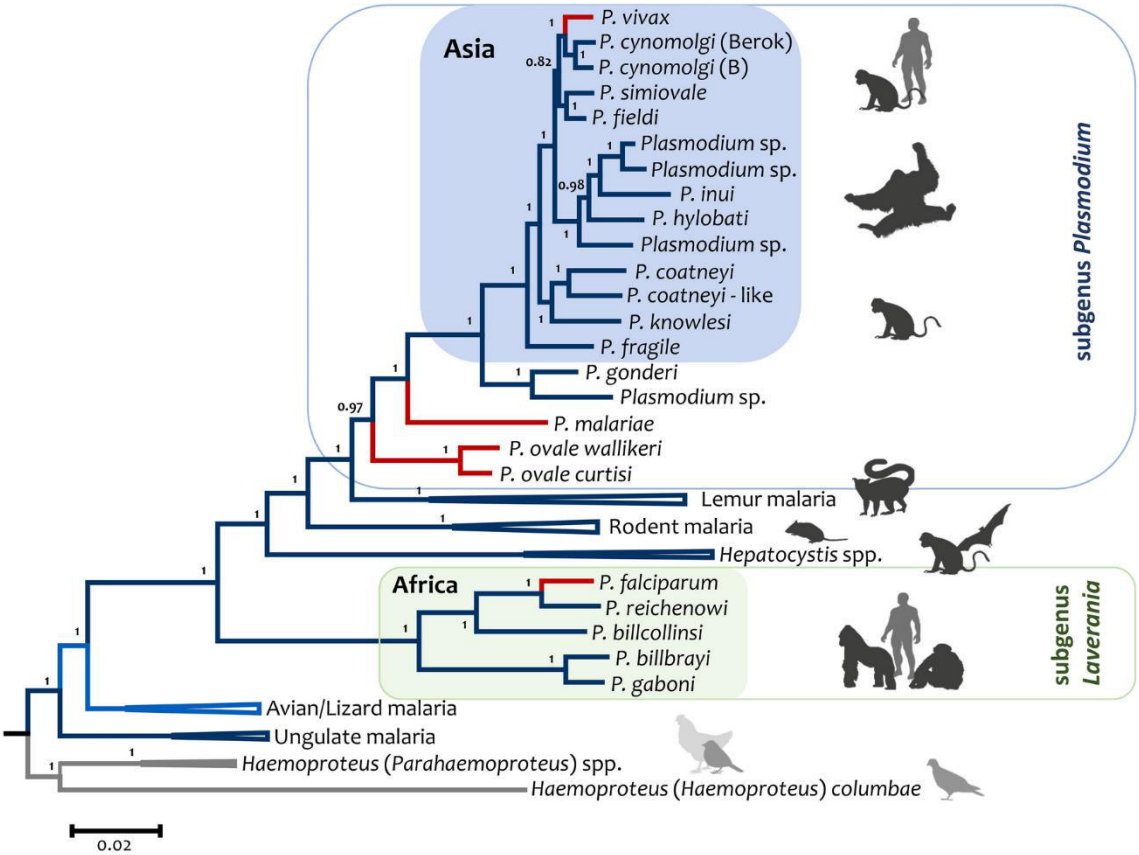


Figura 1: Árbol filogenético de *Plasmodium* spp. según su genoma mitocondrial Las líneas rojas indican a las especies que infectan naturalmente al hombre y las líneas azules a las especies que infectan a los PNH (Tomado de Escalante *et al*., 2022).

2.1.1.1.1. *Plasmodium vivax* (Grassi y Feletti, 1890)

Es el principal causante de malaria humana en América y Asia, y se encuentra ampliamente distribuido en regiones tropicales, subtropicales y templadas (OMS, 2022). Infecta eritrocitos inmaduros (reticulocitos) y puede mantener baja parasitemia en la fase eritrocítica de su ciclo biológico; además, puede desarrollar un estadío denominado hipnozoito, que puede permanecer latente en el hígado durante largos periodos de tiempo y reactivarse posteriormente provocando infecciones recurrentes (Howes *et al*., 2016). Los trofozoítos inmaduros presentan forma de anillo y los trofozoítos maduros forma redonda o ameboide, pueden tener varios núcleos y gránulos rosáceos denominados "puntos de Schüffner". Los esquizontes eritrocíticos producen entre ocho a 24 merozoítos, los macrogametos miden de nueve a 10µm de diámetro, tiñen intensamente y poseen núcleo compacto con gránulos de pigmentos distribuidos uniformemente, mientras que los microgametos son ligeramente más pequeños, su citoplasma tiñe de azul pálido y tienen un núcleo más grande (Soulsby, 1987).

2.1.1.1.2. *Plasmodium falciparum* (Welch, 1897)

Es la especie más patógena de todas, puede infectar a todos los estadíos del eritrocito, y es responsable de más del 90% de las muertes causadas por malaria a nivel mundial. Está distribuido en las regiones tropicales y subtropicales de África, América y Asia, pero es poco frecuente en las regiones templadas (OMS, 2022). Los esquizontes producen de ocho a 32 merozoítos y contienen gránulos de hemozoína, que pueden ser de color marrón oscuro o negro y verse como una masa compacta. Los gametocitos presentan forma de salchicha o luna creciente. Los macrogametos se tiñen de color azul y los gránulos de hemozoína se agrupan alrededor del núcleo, mientras que los microgametos se tiñen de color rojizo y poseen gránulos dispersos. Las formas anillares de los trofozoítos y los gametocitos inmaduros se pueden observar con mayor frecuencia en la sangre periférica (Soulsby, 1987).

2.1.1.1.3. *Plasmodium malariae* (Feletti y Grassi, 1889)

Se encuentra distribuido tanto en las regiones tropicales como subtropicales, aunque su prevalencia es baja en comparación con las otras especies (Phillips *et al*., 2017). Infecta a eritrocitos viejos y también puede mantener baja parasitemia; además, puede persistir durante varios años sin causar síntomas clínicamente evidentes (Ashley *et al*., 2018). Los trofozoítos inmaduros son similares a los de *P. vivax* y los maduros presentan forma de banda, los esquizontes producen de seis a 12 merozoítos y se distribuyen alrededor de una masa de gránulos de pigmento (Deane, 1977). Los macrogametos poseen un núcleo pequeño, que se tiñe intensamente, y gránulos de pigmento gruesos, mientras que los microgametos poseen núcleo grande, que se tiñe ligeramente, y gránulos de pigmento finos y numerosos (Soulsby, 1987).

2.1.1.1.4. *Plasmodium ovale* (Stephens, 1922)

Fue identificado por Stephens, en la sangre de un paciente proveniente de África oriental, y posteriormente describió las características morfológicas junto a Owen (Stephens y Owen, 1927). Su distribución está limitada a las regiones de África y Asia, aunque se han reportado casos importados en Sudamérica (Guerra *et al*., 2019). Los esquizontes producen entre ocho y 10 merozoítos, los gametocitos son similares a los de *P. malariae*, y también presentan puntos de Schüffner y pueden mantenerse en estado de latencia como hipnozoíto (Soulsby, 1987).

2.1.1.2. Especies que infectan a PNH

Se han identificado más de 30 especies de *Plasmodium* que son capaces de infectar naturalmente a PNH, y se estima que todas se transmiten únicamente a través de la picadura de mosquitos hembra infectados del género *Anopheles* (Ramasamy, 2014). En América se han descrito dos especies importantes:

2.1.1.2.1. *Plasmodium brasilianum* (Gonder y Von Berenberg-Gossler, 1908)

Gonder y Von Berenberg-Gossler (1908) realizaron el primer reporte de esta especie en un huapo colorado o uakari (*Cacajao calvus*) proveniente de los bosques tropicales del estado de Amazonas, en Brasil (Coatney *et al*., 2003). Es morfológica y genéticamente similar a *P. malariae* (Fandeur *et al*., 2000) y se ha informado que puede infectar naturalmente al hombre (Lalremruata *et al*., 2015). Actualmente, se encuentra ampliamente distribuido en los bosques de las regiones tropicales de América Central y América del Sur, y se ha reportado en varias especies de primates de las familias Cebidae, Atelidae y Pitheciidae (Fuehrer *et al.*, 2022).

2.1.1.2.2. *Plasmodium simium* (Fonseca, 1951)

Fue reportado por Fonseca en 1951, en un mono aullador (*Alouatta fusca*) de Sao Paulo, en Brasil (Coatney *et al*., 2003). Es morfológica y genéticamente similar a *P. vivax* (Lim *et al*., 2005) y también se ha informado que puede infectar naturalmente al hombre (Brasil *et al*., 2017). Se pensaba que su distribución estaba restringida a los estados de Rio Grande Do Sul, Santa Catarina, Sao Paulo y Espírito Santo, en Brasil (Deane *et al*., 2003); sin embargo, recientemente fue detectado en monos arañas (*Ateles hybridus*), capuchinos blancos (*Cebus versicolor*) y aulladores rojos (*Alouatta seniculus*) de los bosques fragmentados de la Amazonía de Colombia (Rondón *et al*., 2019).

2.1.2. Ciclo Biológico

El ciclo biológico del *Plasmodium* spp. es heteroxeno, complejo e involucra diferentes estadíos (Figura 2). Se desarrolla en dos hospederos, un hospedero vertebrado, que cumple el rol de hospedero intermediario y en donde se va a llevar a cabo el ciclo de multiplicación asexual denominado “ciclo esquizogónico”; y un hospedero invertebrado, que actúa como hospedero definitivo y en donde se produce el ciclo de reproducción sexual denominado “ciclo esporogónico” (Phillips *et al*., 2017).

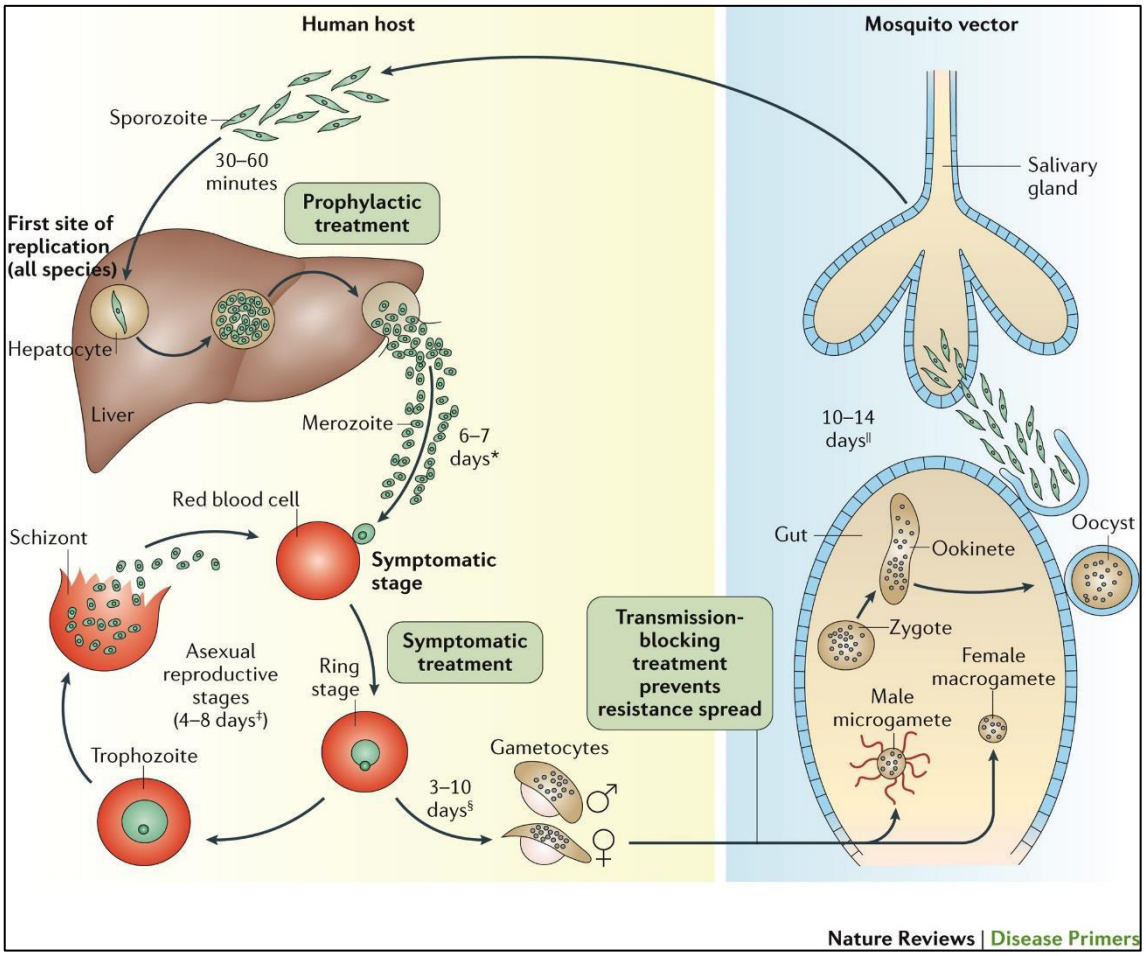


Figura 2: Ciclo biológico de *Plasmodium* spp. (Tomado de Phillips *et al*., 2017)

2.1.2.1. Ciclo esquizogónico

Consta de dos fases, una fase preeritrocítica o hepatocelular, que se lleva a cabo en el hígado, dentro de los hepatocitos, y que se caracteriza por desarrollarse en ausencia de síntomas o signos clínicos; y una fase eritrocítica o sanguínea, que ocurre dentro de los eritrocitos y es la responsable de la aparición de las manifestaciones clínicas de la enfermedad (Phillips *et al*., 2017).

2.1.2.1.1. Fase preeritrocítica

Comienza cuando los esporozoítos, el estadío infectante para los hospederos vertebrados, que se encuentran en las glándulas salivales de los mosquitos hembra infectados del género *Anopheles*, son inoculados en un hospedero vertebrado susceptible, por medio de la probóscide, durante el proceso de alimentación (Ashley *et al*., 2018). Posteriormente, en un periodo de 30 a 60 minutos, se van a transportar a través de la vía hemático-linfática hasta llegar al hígado, en donde van a invadir a los hepatocitos y llevar

a cabo la primera etapa de multiplicación asexual denominada esquizogonia preeritrocítica, que da como resultado la formación del esquizonte preeritrocítico, en cuyo interior se van a dividir los trofozoítos por fisión binaria y se van a desarrollar los merozoítos (Phillips *et al*., 2017). Luego de seis a siete días, los hepatocitos infectados se van a romper liberando a los merozoítos que van a ingresan al torrente sanguíneo (Ashley *et al*., 2018). En algunas especies de *Plasmodium*, algunos de estos merozoítos pueden invadir nuevas células hepáticas y desarrollar una esquizogonia preeritrocítica secundaria (Phillips *et al*., 2017). Además, tanto *P. vivax* como *P. ovale* pueden entrar en estado de latencia en el hígado, como hipnozoíto, y reactivarse posteriormente cuando las condiciones para su reproducción sean favorables (Ashley *et al*., 2018).

2.1.2.1.2. Fase eritrocítica

Durante la fase eritrocítica, los merozoítos van a invadir a los eritrocitos circulantes, en donde van a diferenciarse al estadío de trofozoíto e iniciar la segunda etapa de multiplicación asexual denominada esquizogonia eritrocítica, que resulta en la producción de aproximadamente ocho a 16 merozoítos que invaden nuevos eritrocitos (Phillips *et al*., 2017). El ciclo de multiplicación de los merozoítos dentro de los eritrocitos varía según la especie, durando 36 horas para *P. vivax*, *P. falciparum* y *P. ovale*, y 72 horas para *P. malariae* (Ashley *et al*., 2018). A medida que avanza la infección, algunos merozoítos se van a diferenciar en gametocitos inmaduros, que son las fases infectantes de los mosquitos hembra del género *Anopheles* (Phillips *et al*., 2017). El periodo de duración de la gametogénesis también varía según la especie, y puede durar de tres a 10 días; estos gametocitos inmaduros son haploides y van a circular en la sangre periférica de los capilares del hospedero vertebrado infectado.

2.1.2.2. Ciclo esporogónico

Comienza cuando los gametocitos inmaduros son absorbidos por un mosquito hembra anofelino susceptible durante el proceso de alimentación (Ashley *et al*., 2018). Posteriormente, estos gametocitos van a migrar hacia el intestino delgado del mosquito, en donde van a completar su proceso de maduración sexual como gametocito masculino (microgametocito) y gametocito femenino (macrogametocito). Los microgametocitos y los macrogametocitos se van a fusionar y formar un cigoto diploide, denominado oocineto, que va a adquirir una forma alargada y móvil (Phillips *et al*., 2017). El oocineto

se va a dirigir hacia el lumen intestinal formando un ooquiste, dentro del cual se van a desarrollar los esporozoítos (Ashley *et al*., 2018). Finalmente, el ooquiste se va a romper liberando a los esporozoítos maduros, que van a migrar hacia las glándulas salivales del mosquito, en donde van a permanecer hasta ser inoculados en un nuevo hospedero vertebrado susceptible (Phillips *et al*., 2017; Ashley *et al*., 2018).

2.1.3. Epidemiología

La enfermedad es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, se encuentra ampliamente distribuida en las regiones tropicales y subtropicales de África, Asia, Oceanía, América Central y América del Sur, y es endémica en más de 80 países, sobre todo en países pobres y en vías de desarrollo, provocando más de 200 millones de casos y más de 600 mil muertes al año, especialmente en niños menores de cinco años (OMS, 2022). La prevalencia y transmisión del agente patógeno está influenciada por factores como la distribución de los vectores, las condiciones climáticas y medioambientales, y la accesibilidad a los recursos humanos y sanitarios, así como a los tratamientos médicos (OMS, 2022).

2.1.3.1. Situación de la malaria en el Mundo

Según el último informe mundial de la malaria de la OMS, el número de casos y muertes causadas por esta enfermedad disminuyeron progresivamente durante la última década hasta el año 2019; sin embargo, se incrementaron abruptamente durante los dos últimos dos años (Figura 3A). De acuerdo con sus estimaciones, en el 2020 se reportaron en promedio 245 millones de casos y 625 mil muertes, mientras que en el 2021 las cifras ascendieron a 247 millones de casos y 619 mil muertes (OMS, 2022). África fue la región más afectada, presentando alrededor del 95% de los casos y el 96% de las muertes, de las cuales el 78.9% aproximadamente correspondieron a niños menores de cinco años. La mayoría de los casos y muertes fueron ocasionados por *P. falciparum*, y los grupos etarios más afectados fueron los niños, mujeres embarazadas y personas de la tercera edad. Además, los países que presentaron los mayores números de casos y muertes notificados fueron: Nigeria (26.6%), República Democrática del Congo (12.3%), Uganda (5.1%) y Mozambique (4.1%) (OMS, 2022).

2.1.3.2. Situación de la malaria en América

De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud (OPS), en América más del 70% de los casos son causadas por *P. vivax*. Durante el periodo comprendido entre el 2014 y 2017, se observó un aumento en el número de casos y muertes debido al incremento de la transmisión en Venezuela, Brasil, Colombia, Guyana, Nicaragua y Panamá, y a brotes en Costa Rica, República Dominicana y Ecuador (Figura 3B). En contraste, desde el 2018 el número de notificaciones disminuyeron progresivamente, Paraguay y Argentina recibieron la certificación de países libres de malaria en julio del 2018 y mayo del 2019 respectivamente, y El Salvador y Belice no han reportado casos autóctonos desde el 2017 y 2019 respectivamente (OPS, 2020). En consecuencia, en los últimos tres años ha habido una disminución progresiva en el número de casos y muertes: en el 2019 se reportaron 894 mil casos y 510 muertes; en el 2020, 653 mil casos y 409 muertes; y en el 2021, 597 mil casos y 334 muertes (OMS, 2022).

2.1.3.3. Situación de la malaria en Perú

En el Perú, la malaria es una enfermedad endémica, reemergente y de notificación obligatoria que se encuentra focalizada en las regiones de la Amazonía, sobre todo en las localidades de los departamentos de Loreto, Amazonas y Junín, siendo Loreto el departamento que ha presentado el mayor número e incidencia de casos notificados durante los últimos 10 años (CDC-Perú, 2022a, 2022b), con un predominio de las infecciones causadas por *P. vivax* y en menor frecuencia, por *P. falciparum* (Rosas-Aguirre, *et al*., 2016). De acuerdo con el CDC-Perú, durante el periodo comprendido entre el 2015 y 2020 se observó una disminución gradual en el número de casos y muertes notificadas en el país. Sin embargo, durante los últimos dos años hubo un incremento en el número de casos y muertes por causa de esta enfermedad (Figura N° 3C). En el 2021 se notificaron 18 075 casos y seis muertes causadas por *P. falciparum*, y en el 2022 se notificaron 26 621 casos, cuatro muertes causadas por *P. vivax* y dos muertes por *P. falciparum* (CDC-Perú, 2022). Además, recientemente se han reportado cuatro casos importados de malaria causada por *P. ovale*, detectados mediante diagnóstico microscópico y PCR, en un grupo de soldados peruanos que retornaron al país luego de prestar servicio militar de apoyo a la Organización de las Naciones Unidas (ONU) en la República Centroafricana. Este evento constituye el primer reporte de malaria importada causada por *P. ovale* registrado en el país (Guerra *et al*., 2019).

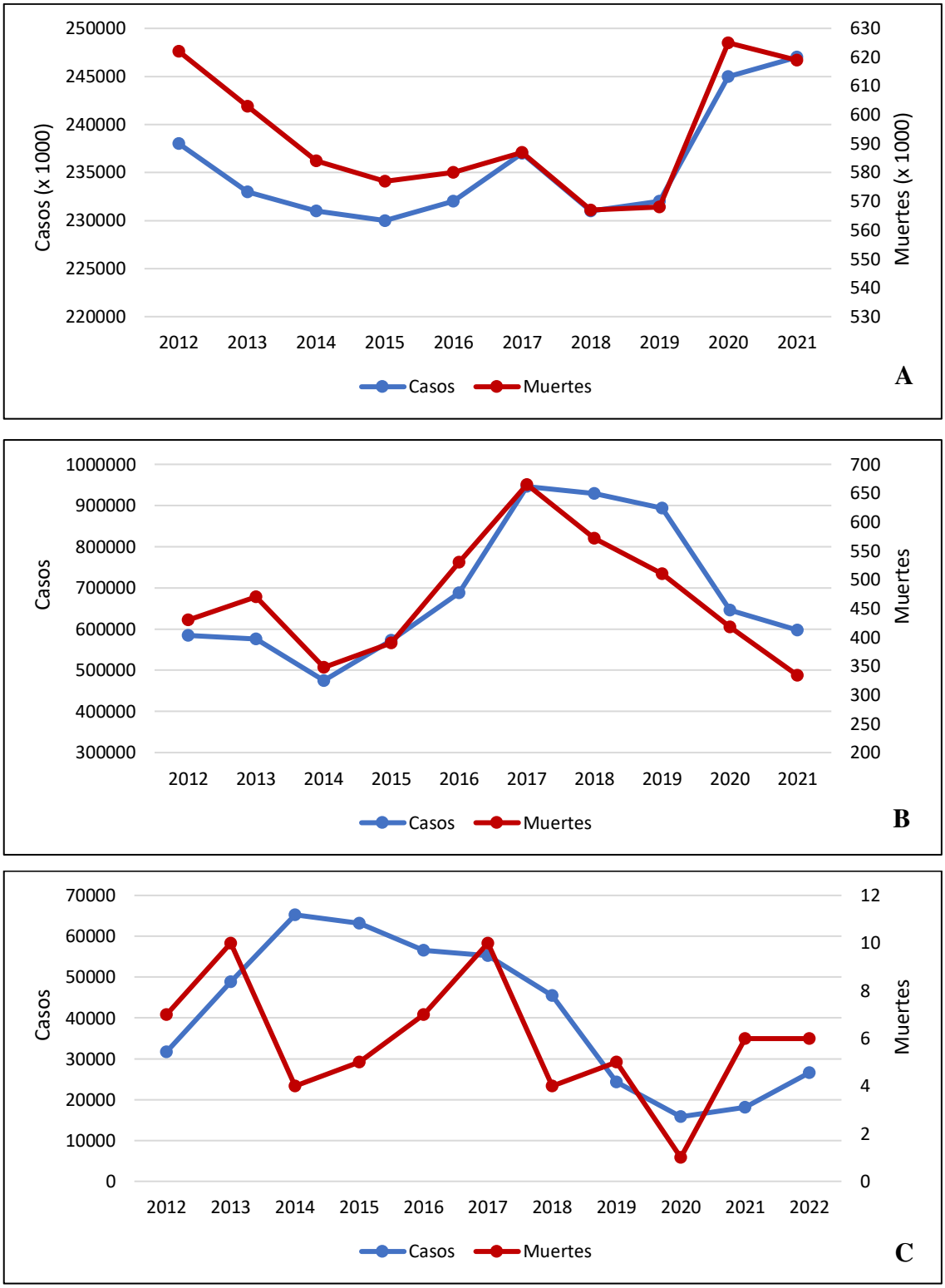


Figura 3: Curva epidemiológica de la malaria durante los últimos 10 años **(A)** Panorama mundial **(B)** Panorama en la región de las Américas **(C)** Panorama en el Perú (Fuente: OMS, 2022; CDC-Perú, 2022b)

2.1.3.4. Efectos de la pandemia de COVID-19

Durante la última década, la malaria ha sido controlada a nivel mundial. Sin embargo, en el 2020, la situación de la malaria fue impactada por la coexistencia de la pandemia de COVID-19 (Zawawi *et al*., 2020). En comparación con las cifras reportadas en el 2019, el número estimado de casos a nivel mundial en el 2020 se elevó en 14 millones y el número de muertes se incrementó en 69 000. Se estima que 47 000 de estas muertes se debieron a interrupciones en los servicios de diagnóstico, tratamiento, control y prevención de la malaria debido a la pandemia (OMS, 2022). En América, se observó una reducción en el número de casos reportados; sin embargo, se presume que esto se debió a las cuarentenas adoptadas por los países sudamericanos lo que trajo como consecuencia una disminución del número de notificaciones. Esta situación fue especialmente preocupante en aquellas regiones en donde habitan comunidades indígenas y poblaciones vulnerables de la Amazonía de Brasil, Colombia y Perú (OPS, 2020). La asociación entre la malaria y COVID-19 puede ser grave, especialmente en países con sistemas de salud deficientes debido a la falta de infraestructura, recursos humanos y financieros (Haakenstad *et al*., 2019). Además, la similitud de los síntomas de la malaria con los de COVID-19 puede conducir a un diagnóstico erróneo y a pasar por alto la posibilidad de una coinfección (di Gennaro *et al*., 2020; Hussein *et al*., 2020).

2.1.4. Diagnóstico

El diagnóstico de la enfermedad se basa en la identificación del parásito, o partes de él, a partir de una muestra de sangre. Este proceso debe ser rápido y preciso para iniciar el tratamiento de manera oportuna y eficaz. El impacto negativo que tiene la enfermedad en la salud pública mundial ha motivado un creciente interés en desarrollar nuevas técnicas de diagnóstico cada vez más efectivas, no solo para emplearlas en países con recursos limitados, sino también para aplicarlas en países desarrollados donde la enfermedad es poco común (Tangpukdee *et al*., 2009).

2.1.4.1. Microscopía

Es considerada la técnica “Gold Standard” para el diagnóstico de *Plasmodium* spp. y es la técnica de elección en los niveles más periféricos de los sistemas de atención primaria de salud debido a su bajo costo; sin embargo, requiere de personal altamente capacitado y experimentado para poder obtener el diagnóstico correcto (Payne, 1988).

Consiste en realizar la identificación morfológica de los estadíos parasitarios que se desarrollan dentro de los eritrocitos infectados del hospedero (trofozoítos, esquizontes y gametocitos) mediante la observación directa de un frotis de sangre grueso (gota gruesa) y delgado, previamente teñidos con tinción Giemsa, Wright o Field y empleando un microscopio óptico a 100x (Warhurst y Williams, 1996).

2.1.4.2. Serología

Se emplean sobre todo en estudios epidemiológicos; sin embargo, su utilidad en zonas endémicas de malaria se ve limitada debido a la exposición frecuente al parásito, lo que provoca que la mayoría de la población que viven en estas zonas presenten anticuerpos constantemente. Actualmente existen diferentes técnicas de diagnóstico serológico entre las que destacan las técnicas de inmunocromatografía y los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) (Liu y Tang, 2013).

2.1.4.2.1. Inmunocromatografía

Las técnicas de inmunocromatografía detectan los antígenos de *Plasmodium* spp. que están presentes en una gota de sangre periférica mediante el uso de anticuerpos monoclonales incrustados en una tira de nitrocelulosa, esto permite la visualización colorimétrica de un complejo antígeno-anticuerpo específico. Los antígenos más empleados son la proteína rica en histidina 2 (HRP-2) y las enzimas lactato deshidrogenasa de *Plasmodium* spp. (pLDH) y aldolasa. Esta técnica es rápida y fácil de usar en condiciones de campo. Sin embargo, es relativamente ineficaz para detectar infecciones de muy baja parasitemia (Moody, 2002).

2.1.4.2.2. ELISA

Es una técnica más sensible para el diagnóstico serológico de la malaria, lo que permite detectar y cuantificar un gran número de muestras en un período relativamente corto de tiempo. Sin embargo, pueden ocurrir reacciones cruzadas de los antígenos de las diferentes especies de *Plasmodium* con los anticuerpos empleados, lo que ha restringido su uso al tamizaje previo a la aplicación de técnicas moleculares para la confirmación final de la infección (Liu y Tang, 2013).

2.1.4.3. Diagnóstico Molecular

Los métodos de diagnóstico molecular están basados en tecnologías de biología molecular que han permitido desarrollar técnicas mucho más sensibles y específicas. Entre los más empleados destacan las técnicas de PCR, amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), *microarrays*, espectrometría de masas (MS) y técnicas de ensayo de citometría de flujo (FCM) (Tangpukdee *et al*., 2009).

2.1.4.3.1. PCR anidada

Es una variante de la PCR convencional que ha sido diseñada para identificar el género y las especies de *Plasmodium* en base a regiones conservadas y variables de su genoma. Consta de dos reacciones de PCR, la primera emplea un par de *primers* externos para amplificar la región conservada del gen de interés, mientras que la segunda utiliza un par de *primers* internos que se unen al producto de la primera PCR para amplificar la región variable específica de cada especie de *Plasmodium* (Snounou *et al*., 1993).

2.1.4.3.2. PCR semianidada-múltiple

También es una variante de la PCR convencional que emplea dos reacciones, pero a diferencia de la PCR anidada, en la segunda reacción se emplean diferentes *primers* internos al mismo tiempo para detectar todas las especies de *Plasmodium* que puedan estar presentes en una muestra a la vez; de esta manera permite ahorrar tiempo y recursos. Fue diseñada inicialmente para detectar las cuatro especies clásicas que infectan a humanos (Rubio *et al*., 1999). Sin embargo, posteriormente fue modificada para incluir la detección de *P. knowlesi* (Miguel-Oteo *et al*., 2017).

2.1.4.3.3. PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real (qPCR) se utiliza para detectar y cuantificar el ADN del *Plasmodium* spp. mediante sondas fluorescentes que se unen específicamente al ADN del parásito, y posee una alta sensibilidad y especificidad, incluso cuando la parasitemia es baja y frente a infecciones mixtas, lo que la vuelve útil en áreas donde la infección es endémica, para determinar la carga parasitaria en pacientes infectados y monitorear la respuesta al tratamiento (Rougemont, 2004). Sin embargo, es necesario realizar la purificación previa de las muestras de ADN, ya que los inhibidores de la PCR provocan la extinción de los fluoróforos e impiden la amplificación y detección eficaces de los productos de la PCR (Taylor *et al*., 2011).

2.2. PNH COMO RESERVORIOS DE *Plasmodium* spp.

Los PNH son considerados por varios autores como reservorios potenciales de diferentes especies de *Plasmodium*, incluyendo a las especies que infectan naturalmente al hombre y causan malaria humana (Ramasamy, 2014). La infección en los primates es similar a la infección en los humanos; sin embargo, las manifestaciones de los signos clínicos de la enfermedad son leves o poco evidentes (Acha y Boris, 2003). Además, algunos autores han reportado que algunas de las especies de *Plasmodium* que infectan naturalmente a PNH, como *P. knowlesi* y *P. cynomolgi* en Asia, o *P. brasilianum* y *P. simium* en América, también pueden infectar y causar enfermedad en el hombre. Estos hallazgos son importantes, tanto para la salud de los primates como para la salud humana, así como para la comprensión de la dinámica de la enfermedad, y pueden tener un impacto negativo en la conservación de estas especies, así como en la salud pública, debido al riesgo potencial de transmisión zoonótica y antroponótica en la interfaz humano-PNH (Antinori *et al*., 2021).

2.2.1. Reportes en el Mundo

Se han reportado varios casos de infecciones por *Plasmodium* en PNH que habitan en diferentes regiones tropicales y subtropicales del Mundo. En Asia, un estudio realizado en Malasia demostró mediante PCR que *P. knowlesi*, que infecta naturalmente a los monos macacos cangrejeros (*Macaca fascicularis*) y cola de cerdo (*Macaca nemestrina*), también estaba infectando y provocando malaria en humanos, pero había sido diagnosticado erróneamente mediante microscopía como *P. malariae* (Singh *et al*., 2004). Posteriormente, otro estudio reportó el primer caso de malaria humana por *P. cynomolgi*, mediante PCR y secuenciamiento genético, que había sido diagnosticado erróneamente como *P. vivax* mediante microscopía y PCR anidada (Ta *et al*., 2014).

Paralelamente, en África, se ha evidenciado mediante estudios moleculares que los chimpancés (*Pan troglodytes*) y gorilas (*Gorilla gorilla*) que habitan en los bosques de las regiones tropicales de África Central están infectados naturalmente con cepas de *P. vivax* y *P. falciparum* que se encuentran estrechamente relacionadas con las cepas de *P. vivax* y *P. falciparum* que infectan a las poblaciones humanas, y que además, son mucho más diversos y carecen de especificidad de hospederos en comparación con las cepas humanas (Liu *et al.*, 2011; 2014).

2.2.2. Reportes en América

En América se han documentado varios casos de PNH infectados naturalmente con *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. brasilianum* y *P. simium*. Además, dos estudios recientes han informado que *P. vivax* y *P. malariae* son morfológica y genéticamente similares a *P. simium* y *P. brasilianum* respectivamente, lo que dificulta su identificación en regiones donde cohabitan estas especies, y al mismo tiempo, sugieren que podría existir riesgo potencial de transmisión zoonótica en aquellas regiones donde cohabitan humanos y PNH (Antinori *et al*., 2021). Por tal motivo, algunos autores que han realizado estudios recientes de vigilancia epidemiológica de *Plasmodium* spp. en PNH que habitan en regiones donde coexisten estos parásitos, han reportado prudentemente sus hallazgos como *P. vivax*/*simium* y *P. malariae*/*brasilianum* (Buery *et al*., 2017; de Abreu *et al*., 2018; Rondón *et al*., 2019).

En Brasil, los estudios iniciales sobre *Plasmodium* spp. en primates fueron realizados entre 1964 y 1973, y se centraron en la identificación del parásito, sus principales vectores y hospederos, así como en su distribución geográfica y su relación con la malaria humana. Para tal fin se emplearon técnicas microscópicas llegando a reportar frecuencias variables de 10.2 a 30% para *P. simium* y de 43.7 a 100% para *P. brasilianum* (Deane, 1977). Posteriormente, con el advenimiento de las pruebas moleculares, se realizaron estudios de identificación empleando técnicas de PCR y secuenciamiento genético. De Castro-Duarte *et al*. (2008) reportaron tempranamente una frecuencia de 5.6% (4/71) para *P. vivax*, 1.4% (1/71) para *P. falciparum* y 5.6% (4/71) para *P. malariae* en monos aulladores marrones (*Alouatta guariba*); y 0.4% (1/235) para *P. vivax*, 0.8% (2/235) para *P. falciparum* y 5.5% (13/235) para *P. malariae* en monos aulladores negros (*Alouatta caraya*) empleando la técnica de PCR semianidada-múltiple descrita por Rubio *et al.* (1999). Por otro lado, Figueiredo *et al*. (2017) reportaron una frecuencia de 29.81% (48/161) y 34.16% (55/161) para *Plasmodium* spp. mediante la técnica molecular de Rubio *et al*. (1999) y una qPCR respectivamente, obteniendo resultados positivos para *P. malariae*/*P. brasilianum* en el 97.92% (47/48) de los PNH evaluados, de los cuales ocho eran de vida libre y 39 de cautiverio; y recientemente, Silva *et al*. (2019) reportaron *P. vivax* y *P. falciparum* en el 2.04 % (2/98) y el 4.08 % (4/98) de PNH de la región de Manaos, respectivamente, en el noroeste de la Amazonía Brasileña, empleando también la PCR de Rubio *et al*. (1999).

En Colombia, Renjifo hizo el primer reporte de *P. brasilianum* mediante técnicas microscópicas (Deane, 1977). Posteriormente, Rondón *et al*. (2019) evaluaron a los PNH que habitan en bosques fragmentados de la Amazonía Colombiana, empleando la técnica de Rubio *et al*. (1999) y una técnica de PCR en base al gen *cox*3, detectando *P. vivax*/*simium* en el 11.11% (2/18) de *A. hybridus*, 8.3% (2/24) de *C. versicolor* y 16.6% (4/24) de *A. seniculus*. Además, detectaron frecuencias del 4.3% (1/23) y 9% (1/11) de *P. falciparum*, y del 4.1% (1/24) y 40% (2/5) de *P. malariae*/*brasilianum* en *A. seniculus*. También reportaron coinfecciones entre *P. vivax*/*simium* y *P. malariae*/*brasilianum* en el 11.11% (2/18) de *A. hybridus* y el 20% (1/5) de *A. seniculus*. Finalmente, un estudio reciente detectó una frecuencia de *P. falciparum* del 3.85% (1/26) en monos chichicos (*Leontocebus lagonotus*/*Saguinus lagonotus*) de la Amazonía Occidental del Ecuador empleando técnicas moleculares (Carrillo-Bilbao *et al*., 2021).

2.2.3. Reportes en el Perú

En nuestro país existen alrededor de 42 especies de PNH, clasificados en tres familias y 12 géneros, que se encuentran ampliamente distribuidos en los bosques secos costeros, bosques montanos y premontanos, y bosques de selva baja de la Amazonía Peruana (Pacheco *et al*., 2021). Sin embargo, los estudios de vigilancia de *Plasmodium* spp. en estos primates son escasos. A la fecha solo se han reportado cinco estudios realizados en PNH de vida libre y en cautiverio. Los dos primeros estudios se realizaron en PNH de vida libre que habitan en el noreste de la Amazonía Peruana. El primero detectó *P. brasilianum*, mediante las técnicas microscópicas de la gota gruesa y frotis sanguíneo, en el 24% (12/50) y 21.05% (4/19) de monos ardillas (*Saimiri sciureus* y *S. boliviensis* respectivamente), 16.33% (8/49) de monos arañas negros (*Ateles chamek*, antes *A. paniscus*) y 29.41% (10/34) de monos choros (*Lagothrix lagothricha*, antes *L. infumata*) que viven en los bosques tropicales de selva baja de la región de Loreto (Dunn y Lambrecht, 1963), mientras que el segundo fue un estudio serológico que detectó la presencia de IgM contra *P. falciparum* en el 17% (6/34) de *S. sciureus* que viven en los bosques tropicales del margen derecho del río Amazonas, sugiriendo que podrían estar infectados con *P. falciparum* (Gozalo *et al*., 1997).

Posteriormente, se han realizado dos estudios en PNH mantenidos en condiciones de cautiverio. El primero identificó la presencia de *Plasmodium* spp. en el 7.06% (6/85)

de PNH de varios zoológicos y centros de rescate de Lima, Cuzco, Yurimaguas, Pucallpa y Puerto Maldonado (Zariquiey, 2014) mediante técnicas microscópicas. Posteriormente, Ochoa (2018) realizó la identificación molecular de las muestras positivas a la microscopía, empleando la PCR anidada en base al gen codificante de la subunidad 18S del ARN ribosómico descrita por Snounou *et al*. (1993) y secuenciamiento de Sanger, detectando *P. brasilianum* en una muestra de *L. lagothricha*, y *P. malariae* en cuatro muestras de *S. sciureus*.

Finalmente, el último estudio publicado fue un estudio longitudinal realizado durante el periodo comprendido entre los años 2012 y 2015 que reportó mediante técnicas microscópicas y moleculares una prevalencia crónica del 11 ± 3% de *P. brasilianum* en monos pichicos comunes (*Saguinus fuscicollis*) y emperadores (*Saguinus imperator*) de vida libre que habitan en los bosques tropicales de la región de Madre de Dios, al sur de la Amazonía Peruana (Erkenswick *et al*., 2017). No se han reportado estudios realizados en PNH mantenidos en condiciones de semicautiverio.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE ESTUDIO

El estudio se realizó en la concesión de las Islas Iquitos, Muyuy y Padre Isla, de la Cuenca Amazónica Peruana (Cuadro 1), otorgada por el Gobierno Regional de Loreto (GORE-Loreto) a la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), mediante resolución ejecutiva directoral N° 006-2016-GRL-GGR-ARA-DEFFS-DER, como área de manejo evaluativo y extractivo, y que se encuentra bajo la administración del Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura-Iquitos (IVITA-Iquitos), que pertenece a la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM (FMV-UNMSM). El periodo inicial del estudio estuvo comprendido entre julio del 2019 y julio del 2021; sin embargo, se tuvieron que suspender las actividades debido a la cuarentena decretada por el Gobierno Peruano como consecuencia de la pandemia de COVID-19. Posteriormente, se reiniciaron las actividades en julio del 2021 y culminaron en febrero del 2023.

Cuadro 1: Localización geográfica de la concesión de las islas Iquitos, Muyuy y Padre Isla, Provincia de Maynas, departamento de Loreto, Perú

Distrito	Concesión	Coordenadas UTM		
		Zona	Este	Norte
Belén	Isla Iquitos	18S	703095.0000	9591767.0000
Belén	Padre Isla	18S	705184.6500	9599814.6000
Fernando Lores	Isla Muyuy	18S	703612.5909	9576684.6000

3.1.1. Isla Iquitos

Se encuentra en el noreste de la Amazonía Peruana, dentro del río Amazonas, aproximadamente a una distancia de 15 km aguas abajo al noreste de la ciudad de Iquitos y a una altura de 79 m.s.n.m. (Figura 4). Cuenta con una superficie total de 52.74 km^2 y presenta ocho caseríos: Caro Cocha, Isla Iquitos, Padre Cocha, Progreso, San Pedro, Santa Cruz, Santa María y Santa Zulema. En esta isla se ha reportado la especie *Saimiri boliviensis* (Soini, 1990). Se estima que, actualmente la población de *S. boliviensis* es de 658 individuos aproximadamente (C. Ique, datos no publicados).

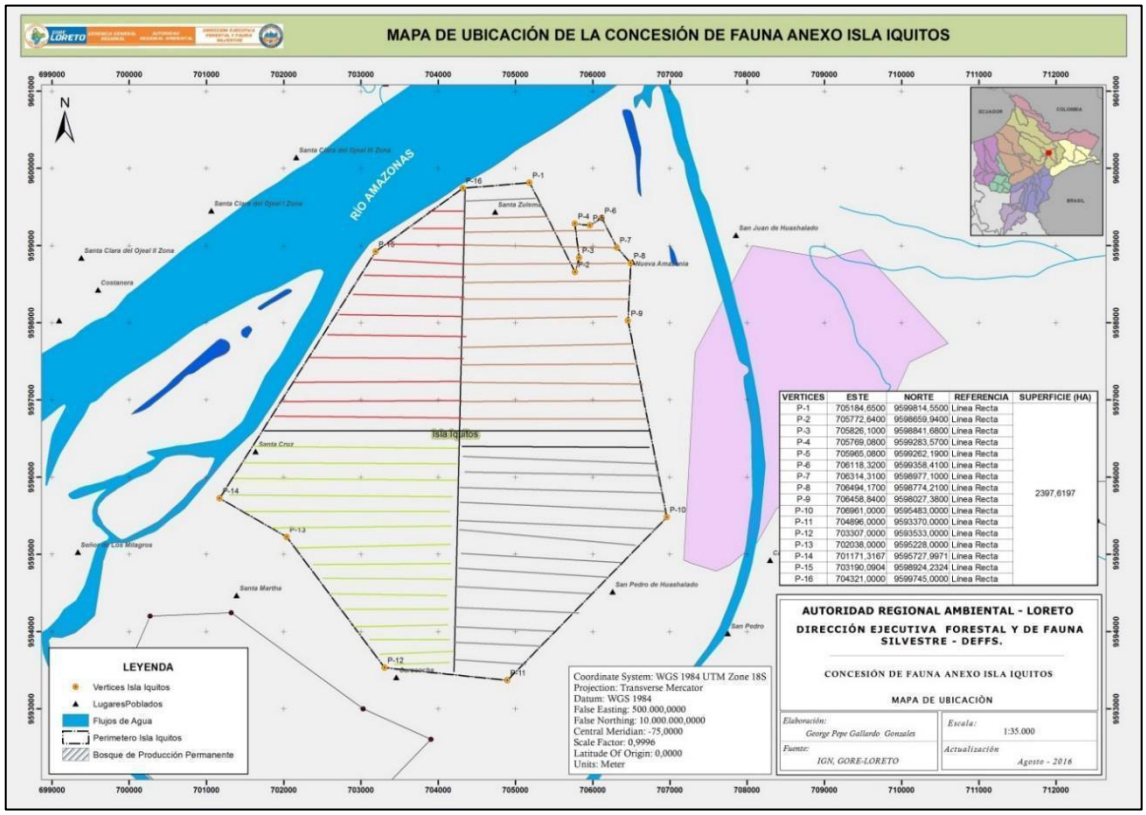


Figura 4: Mapa de la concesión de la Isla Iquitos (Tomado del GORE-Loreto)

3.1.2. Isla Muyuy

Está situada en el noreste de la Amazonía Peruana, delimitado por el río Amazonas, aproximadamente a 18 km aguas arriba al suroeste de la ciudad de Iquitos y a 106 m.s.n.m. (Figura 5). Tiene una superficie total de 44.7 km^2 en donde se encuentran asentados 8 caseríos: Nueva Amazonía, Pihuicho, Isla Palestina, Timareo, Timareo 1ra Zona, Timareo 2da Zona, Timareo 3ra Zona y Santa Ana de Muyuy (Ique y Aquino, 2015). En esta isla se encuentra la especie alóctona *Saguinus labiatus*, procedente de la

zona de Iberia-Iñapari de la región de Madre de Dios, en el sureste de la Amazonía Peruana, que fue introducida en 1988 por investigadores del Proyecto Peruano de Primatología (Moya *et al*., 2000). Se estima que la población actual de *S. labiatus* es de 404 especímenes en promedio (C. Ique, datos no publicados).

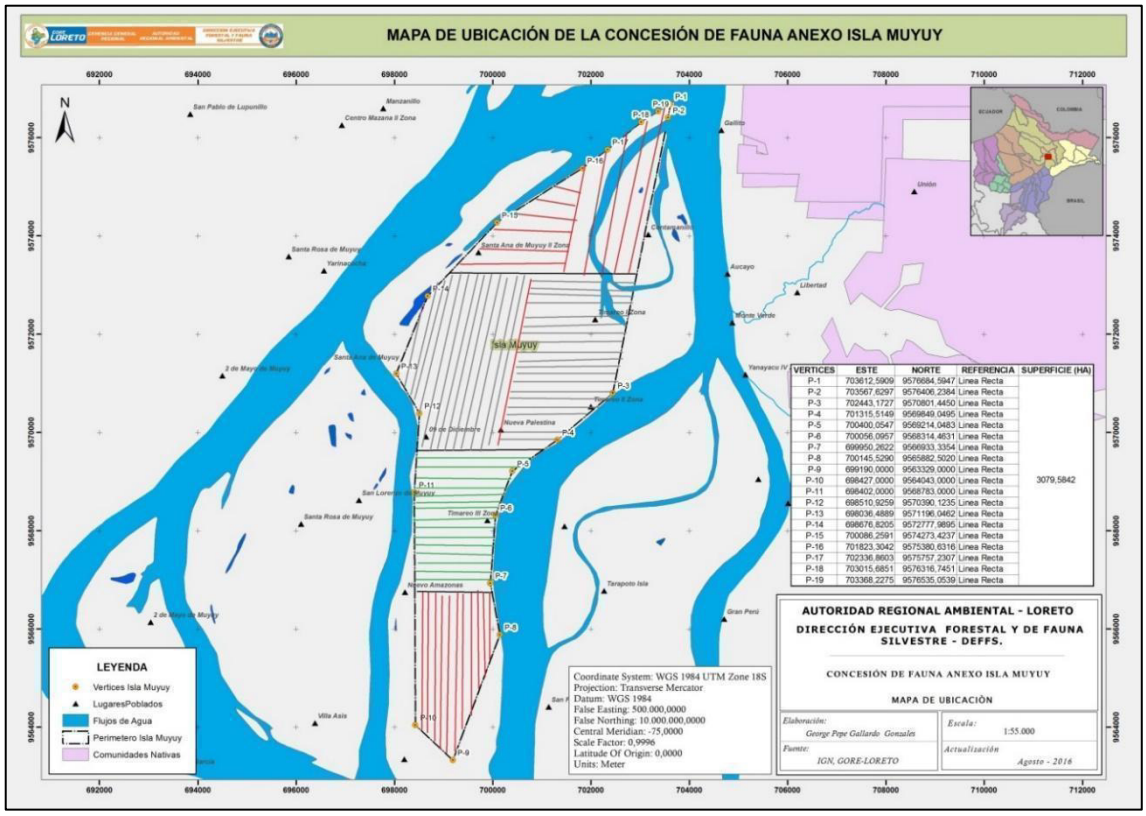


Figura 5: Mapa de la concesión de la Isla Muyuy (Tomado del GORE-Loreto)

3.1.3. Padre Isla

Está ubicada en el noreste de la Amazonía Peruana, en el rio Amazonas, aproximadamente a 8.5 km aguas abajo al noreste de la ciudad de Iquitos y a 77 m.s.n.m. (Figura 6). Cuenta con una superficie total de 15 km^2 y presenta dos caseríos: Dos de Mayo y Padre Isla (Ique y Aquino, 2015). En esta isla se encuentra la especie alóctona *Saguinus mystax*, provenientes del lado oriental del río Amazonas, que también fue introducida entre 1977 y 1980 por investigadores del Proyecto Peruano de Primatología (Moya *et al*., 1990). Se estima que la población actual de *S. mystax* es de 548 animales (C. Ique, datos no publicados).

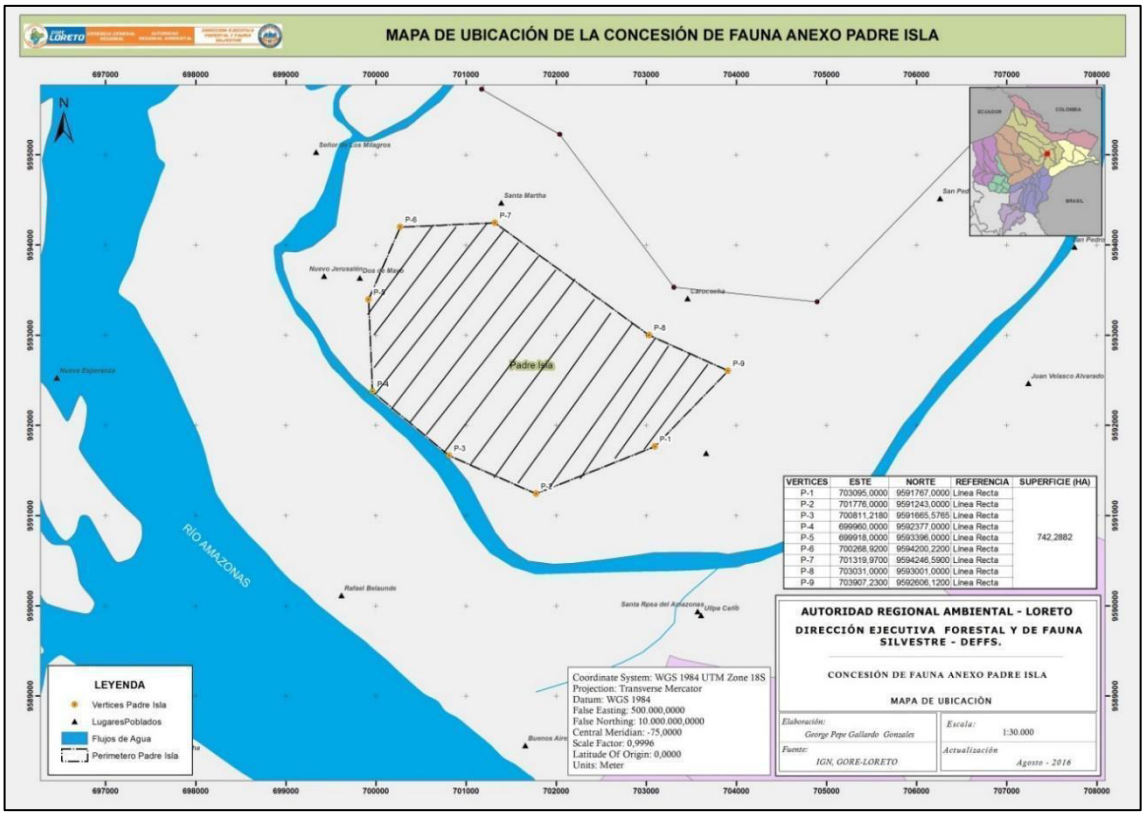


Figura 6: Mapa de la concesión de Padre Isla (Tomado del GORE-Loreto)

3.2. DESCRIPCIÓN DEL MATERIAL EXPERIMENTAL

Se emplearon 75 muestras de sangre colectadas de especímenes adultos de PNH, de las especies *S. boliviensis*, *S. labiatus* y *S. mystax*, mantenidos en condiciones de semicautiverio dentro de la concesión de las Islas Iquitos, Muyuy y Padre Isla, respectivamente, del departamento de Loreto, en la Cuenca Amazónica Peruana. El resto de los materiales y equipos empleados en este estudio se detallan en el anexo 1.

3.2.1. *Saimiri boliviensis* (Hershkovitz, 1984)

Está clasificado taxonómicamente dentro del orden Primate, familia Cebidae y género *Saimiri* (Pacheco *et al*., 2021). Viven en grupos de 45 a 75 individuos en los bosques tropicales de la Amazonía Peruana, al sur del río Marañón y Amazonas, y entre los ríos Ucayali y Tapiche. Posee una máscara blanca alrededor de los ojos y la boca, y el característico arco romano en la frente, que lo diferencia de las otras especies de *Saimiri* (Figura 7), la corona y región preauricular son de color gris oscuro a negro, el pelo del cuerpo y las extremidades es de color amarillento pálido con pelos color negro, y la cola es amarillo a agutí, excepto la porción terminal que es negra (Hershkovitz, 1984).



Figura 7: Ejemplar de *S. boliviensis* (Tomado de Moine, 2019)

3.2.2. *Saguinus labiatus* (É. Geoffroy Saint-Hilaire, 1812)

Se encuentra dentro del orden Primate, familia Cebidae y género *Saguinus* (Pacheco *et al*., 2021). Presenta una coloración negruzca en la región dorsal del cuerpo y rojiza en la parte ventral (Figura 8), y está estrechamente relacionado con el grupo *mystax*, que incluye a *S. mystax* y *S. imperator* (Marczynska *et al*., 1983). Habita en los bosques primarios y secundarios de la Amazonía Peruana, Brasileña y Boliviana, al norte del río Tahuamanu hasta la frontera con Brasil, en grupos conformados por dos a siete individuos (Buchanan-Smith, 1990).



Figura 8: Ejemplar de *S. labiatus* (Tomado de Marent, 2015)

3.2.3. *Saguinus mystax* (Spix, 1823)

Pertenece al orden Primate, familia Cebidae y género *Saguinus* (Pacheco *et al*., 2021). Habita en los bosques primarios y secundarios de la Amazonía Peruana y Brasileña, al sur del río Amazonas, entre el río Ucayali y el río Purús, en grupos de tres a 10 individuos y en simpatría con *Leontocebus fuscicollis/Saguinus fuscicollis* (Heymann, 2022). El área circumnarial y circumbucal es de color blanco y resto de la cara la cabeza y el cuerpo es de color negro con tonalidades marrón negruzca (Figura 9), las extremidades y la superficie superior de las manos y los pies son de color negros (Lopes *et al*., 2023).



Figura 9: Ejemplar de *S. mystax* (Tomado de Heymann y Ganzhorn, 2015)

3.3. MÉTODO

3.3.1. Consideraciones Éticas

Se solicitó la autorización con fines de investigación científica en fauna silvestre fuera de áreas naturales protegidas al Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR), en concordancia con lo descrito en el Decreto Supremo N° 019-2015-MINAGRI, que aprueba el Reglamento para la Gestión de Fauna Silvestre, recibiendo autorización mediante RD 559-2019-MINAGRI-SERFOR-DGGSPFFS. Cabe mencionar que esta autorización implica que se cumplan con las normas y requisitos establecidos por Ley para garantizar la protección y conservación de la fauna silvestre involucrada en el estudio de investigación.

Además, se solicitó la evaluación bioética del proyecto de investigación, del cual se deriva esta tesis, al Comité de Ética y Bienestar Animal (CEBA) de la FMV-UNMSM, obteniendo la aprobación mediante Constancia de Autorización Ética Nº 2021-11, lo que permite su realización de acuerdo con las normas y procedimientos establecidos para garantizar la ética y el bienestar animal en la investigación.

3.3.2. Cálculo del tamaño de la muestra

Para determinar el tamaño de la muestra del estudio se empleó la fórmula para proporciones de poblaciones finitas propuesta por Daniel y Cross (2013), mediante el software online WINEPI® (http://www.winepi.net/):

$$n = \frac{Z^2.N.p.q}{d^2(N-1) + Z^2.p.q}$$

Donde:

$n =$ número de muestra.

$Z =$ valor del intervalo de confianza.

$N =$ población.

$p =$ prevalencia histórica o referencial.

$q =$ diferencia de proporción con respecto a p.

$d =$ error absoluto permitido.

La población total de PNH (N=1610) se estimó empleando el promedio de los últimos 10 censos anuales realizados mediante el método de transecto lineal durante el periodo comprendido entre los años 2007 y 2016; no se tomó en cuenta el periodo comprendido entre el 2017 y 2020 debido a que no se obtuvieron registros de censos realizados durante esos años (C. Ique, datos no publicados). La prevalencia histórica o referencial empleada fue del 29.81%, de acuerdo con el reporte de Figueiredo *et al*. (2017), el nivel de confianza utilizado fue del 90% ($Z_{\alpha/2}$ = 1,645) y el error absoluto permitido fue del 10%, obteniendo un tamaño de muestra de al menos 55 PNH para el área total del estudio.

Debido a que la población de PNH fue diferente en cada isla, se procedió a realizar un muestreo aleatorio estratificado para obtener la proporción de la muestra para cada una de las islas, empleando la fórmula descrita por Daniel y Cross (2013):

$$n_1 = \frac{N_1}{N} n$$

Donde:

n_1 = número de muestra del estrato.

N_1 = población del estrato.

n = número de muestra total.

N = población total.

Se obtuvieron como tamaños de muestra mínimo por estrato al menos: 22 PNH para la Isla Iquitos, 14 PNH para la Isla Muyuy y 19 PNH para Padre Isla. Finalmente, se emplearon: 24 PNH de la Isla Iquitos (Anexo 2), 21 PNH de la Isla Muyuy (Anexo 3) y 30 PNH de Padre Isla (Anexo 4), sumando un total de 75 muestras de sangre de PNH, de acuerdo con el permiso otorgado por el SERFOR.

3.3.3. Captura de PNH

Para realizar la captura de los primates se emplearon las metodologías descritas por Encarnación (Encarnación *et al*., 1990) y Tapia (Tapia *et al*., 1990), con algunas modificaciones. Estas metodologías constan de las siguientes fases:

3.3.3.1. Instalación del campamento base

Se establecieron dos campamentos base, uno en la estación biológica de la Isla Muyuy y el otro en la estación biológica de Padre Isla. Desde ahí se dirigieron las campañas de localización, acostumbramiento y captura de PNH.

3.3.3.2. Localización de las tropas de PNH

Entre las 05:00 a 11:00 horas, se exploraron sigilosamente los transectos lineales construidos previamente en las islas, a una velocidad aproximada de 1km/h, para localizar las tropas de primates. Una vez localizadas, se registró su ubicación y se identificó el género y la especie de acuerdo con sus características morfológicas en una libreta de notas de campo (*Rite in the Rain*®, USA) (Encarnación *et al*., 1990).

3.3.3.3. Colocación de los cebos y acostumbramiento

Se colocaron cebos en ramas cercanas de cuatro a cinco puntos identificados, distribuidos en un área de 100 a 150m, y a una altura de tres metros aproximadamente. Se emplearon plátanos del género *Musa* como cebo. Luego de tres horas, se retornó al lugar donde se dejaron los cebos, para verificar si estos habían sido consumidos. Una vez que la tropa aceptó los cebos, siguieron colocándose convenientemente de la misma manera y en el mismo lugar, en la mañana y la tarde, para acostumbrarlos (Encarnación *et al*., 1990).

3.3.3.4. Construcción de la trampa y escondite

Se construyó un soporte con material de la zona en el lugar elegido para la trampa. Se fijó al suelo, mediante cuatro troncos verticales de 2m de altura y sobre ella se instaló la "trampa Saguinus", una estructura rectangular construida con listones de madera y malla metálica, y sujetada con lianas por sus cuatro aristas, de 1.5m de largo por 0.35m de alto y 0.4m de profundidad, divida en diez celdas con puertas independientes, manipuladas mediante hilos de nylon. A una distancia de 8 a 10 metros, se construyó el escondite denominado "chapana". Consiste en un puesto de observación, de forma cónica, cubierto con hojas de palmeras. Por medio del mirador se ordenaron los hilos de nylon, de izquierda a derecha y sin entrecruzamientos. Una vez instalada la "trampa *Saguinus*" y la "chapana", se colocaron los cebos convenientemente, durante dos a tres días consecutivos, de la siguiente manera: Primero, sobre la trampa y las puertas abiertas. Luego en el fondo de la trampa, a dos tercios de la base, sujetos mediante una soguilla. Se verificó la aceptación durante dos a tres repeticiones diarias antes de modificar la posición de colocación del cebo (Tapia *et al*., 1990).

3.3.3.5. Captura propiamente dicha

Cuando los animales aceptaron el cebo en el interior de la trampa, se procedieron a realizar los atrapamientos cerrando lentamente las puertas de cada una de las celdas. Las capturas se realizaron entre las 05:30 a 08:00 horas. Se separó la trampa del soporte y se cubrió con una manta oscura para disminuir el estrés en los animales capturados. Con la ayuda de guantes de cuero, los animales se transfirieron a jaulas de retención temporal, provistas con agua y alimento (Tapia *et al*., 1990).

3.3.4. Toma de muestra

3.3.4.1. Cálculo del peso y de la dosis del espécimen

Con la ayuda de un personal técnico debidamente entrenado, se capturó al animal empleando una malla de captura "atrapa monos", que fue pesada previamente en una balanza. Una vez que el animal fue capturado, se pesó la malla con el animal adentro y se obtuvo el peso del animal por diferencia aritmética. Se registró el peso obtenido y se calculó la dosis en miligramos y el volumen en mililitros del anestésico a emplear durante la contención química empleando una regla de tres simple.

3.3.4.2. Contención física y química e identificación del sexo

El personal técnico, sujetó con una mano la cabeza del ejemplar, empleando los dedos pulgar, índice y medio, por detrás del cuello; y con la otra mano, los miembros pélvicos y la cola, ejerciendo la presión suficiente para inmovilizar al animal y reducir los riesgos de accidente por mordedura. Se inoculó una solución de Clorhidrato de ketamina al 10% (Ketalar®, Pfizer, USA), a una dosis de 10mg/kg vía intramuscular, en la región del muslo de uno de los miembros posteriores del animal, a la altura del paquete muscular conformado por el músculo cuádriceps femoral, de acuerdo con los reportes de algunos autores (Gozalo, 1985; Alfonso, 2014; Cornejo, 2015). Una vez que la solución anestésica hizo efecto, se identificó y registró el sexo del espécimen mediante observación directa y reconocimiento de los genitales externos.

3.3.4.3. Toma de muestra de sangre

Se colectó 1-2mL de sangre, mediante una técnica de venopunción aséptica realizada en la vena femoral de uno de los miembros posteriores, empleando una jeringa de 3mL (Nipro Corporation, Japón) y una aguja de 21Gg por 1 pulgada (Nipro Corporation, Japón). Una parte de la muestra obtenida fue colocada en un tubo estéril con EDTA (Vacutainer™, BD, USA) y se le agregó Solución *Longmire* en proporción 1:10 (Longmire *et al*. 1997), se homogeneizo y se conservó a temperatura de refrigeración (4°C) hasta su traslado y procesamiento posterior en el laboratorio de Biología y Genética Molecular de la FMV-UNMSM. La sangre restante fue empleada para realizar la identificación microscópica.

3.3.5. Identificación microscópica

Se empleó el protocolo descrito en la Norma Técnica del Instituto Nacional de Salud del Perú (INS, 2003), con algunas modificaciones. Las muestras de sangre fueron procesadas en el Laboratorio de Microbiología del IVITA-Iquitos, y posteriormente fueron analizadas con la ayuda de un personal técnico calificado en el diagnóstico microscópico de *Plasmodium* spp. La metodología empleada fue la siguiente:

3.3.5.1. Elaboración de la Lámina

3.3.5.1.1. Gota gruesa

Previamente, se homogenizó la muestra contenida dentro del tubo EDTA. Luego, con la ayuda de un tubo capilar, se colocó una gota de sangre, de aproximadamente 0.5mm de diámetro, en uno de los tercios distales de una lámina portaobjetos. Usando la esquina de otra lámina portaobjetos (lámina auxiliar) se procedió a extender la gota realizando movimientos circulares (INS, 2003).

3.3.5.1.2. Frotis sanguíneo

Con el mismo tubo capilar, se colocó otra gota de sangre, de aproximadamente 0.3mm de diámetro, en el tercio medio de la lámina portaobjeto, y con la ayuda de la lámina auxiliar, inclinada en un ángulo de 45°, se realizó el frotis. Finalmente, se dejó secar a temperatura ambiente (INS, 2003).

3.3.5.2. Tinción de la Lámina

Las láminas secadas previamente se colocaron encima de unas varillas de vidrio y sobre ellas se vertió suavemente una solución de tinción Giemsa al 5%, se dejó actuar durante diez minutos, se lavó con agua destilada a chorro suave para retirar el exceso del colorante y se dejó secar a temperatura ambiente (INS, 2003).

3.3.5.3. Observación de la Lámina

Las láminas teñidas se observaron empleando un microscopio óptico (Microscopio LED Carl Zeiss™ Primo Star HAL, Carl Zeiss AG, Alemania) a 100x con aceite de inmersión, a fin de identificar los estadíos sanguíneos del parásito (Figura 10) de acuerdo con las características morfológicas descritas por Coatney *et al.* (2003). Los resultados fueron registrados para ser analizados posteriormente.

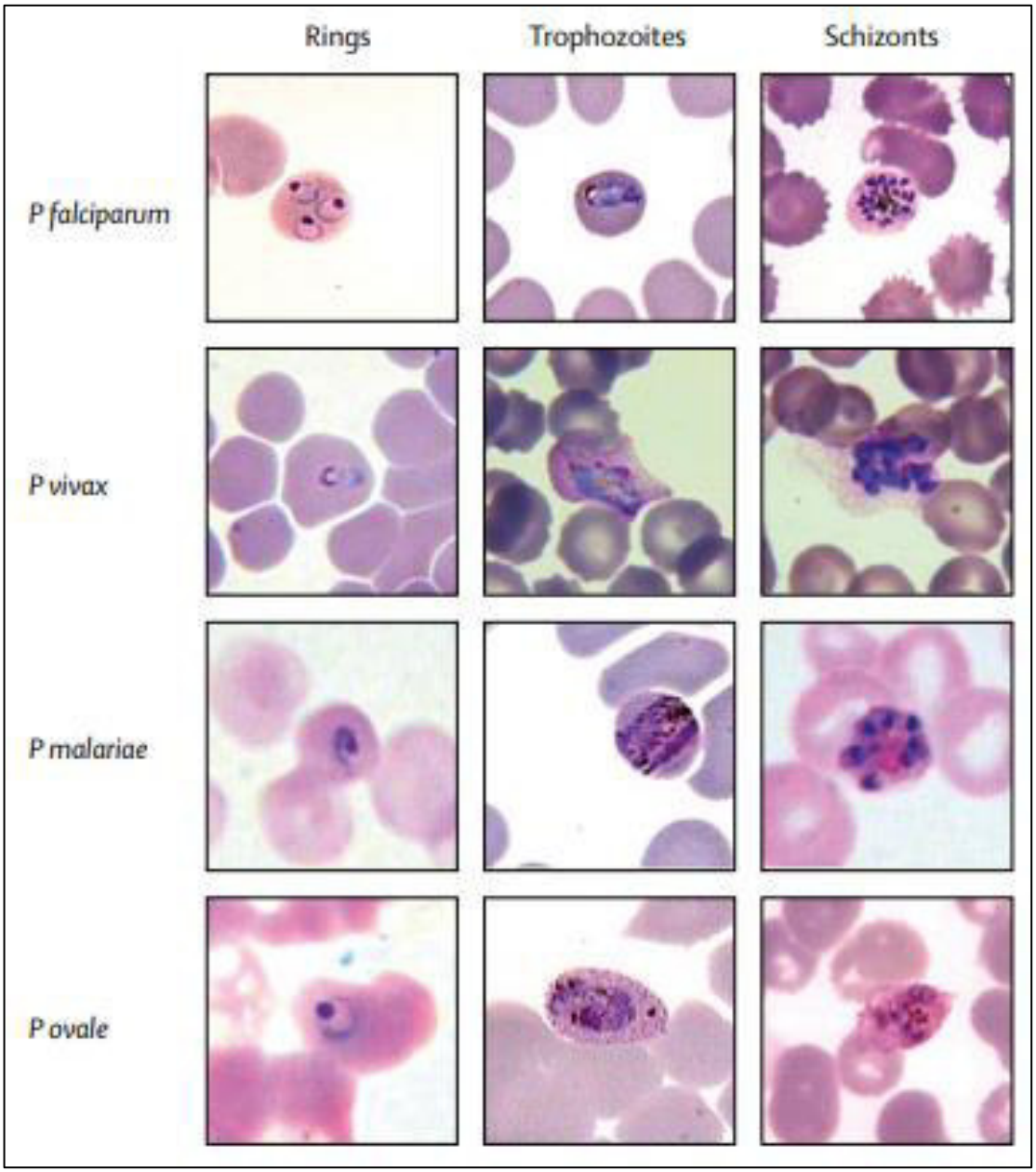


Figura 10: Estadíos sanguíneos de *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* y *P. ovale* (Modificado de Ashley *et al*., 2018)

3.3.6. Identificación molecular

3.3.6.1. Extracción del ADN de las muestras de sangre de PNH

Se empleó la técnica descrita por Maturrano *et al*. (2012) con algunas modificaciones. Brevemente, en un tubo Eppendorf de 2mL estéril y libre de nucleasas, se añadió 800µL de Sol. *Queen Lysis Buffer* (QLB), 200µL de la muestra de sangre y 20µL de proteinasa *k*. Se mezcló e incubó a 57°C *overnight*. Posteriormente, se añadió 800µL de Sol. Fenol-Cloroformo (PanReac AppliChem, ITW reagents, USA), se mezcló

por 5 minutos, se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos y se removió la fase acuosa a otro tubo. Se agregó 500µL de Isopropanol (Merk, Alemania), se mezcló e incubó en frío por 1 hora. Se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se agregó 1mL de etanol (Sigma-Aldrich, USA). Se mezcló por 5 minutos, se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente durante 3 horas. Finalmente, se resuspendió en 50µL de *Buffer* Tris-EDTA y se conservó a una temperatura de -20°C en una congeladora (Biobase, China).

3.3.6.2. Extracción del ADN de las muestras controles

Los controles positivos se obtuvieron a partir de las muestras UKNEQAS-5535 y UKNEQAS-5536, que contenían 40µL de eritrocitos humanos infectados con *P. vivax* y *P. falciparum* respectivamente y que fueron donadas por el Grupo de Investigación en Malaria del laboratorio de Malaria de la Facultad de Ciencias e Ingeniería de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (FACIEN-UPCH). Para tal fin, se empleó un kit de extracción de ADN comercial en base al método de columnas (PureLink™ Genomic DNA Mini Kit Invitrogen®, Thermo Fisher Scientific, USA) y la extracción del ADN se realizó de acuerdo con las recomendaciones descritas por el fabricante.

3.3.6.3. Estandarización de la PCR semianidada-múltiple

Se emplearon las condiciones de la PCR semianidada-múltiple descrita previamente por Rubio *et al*. (1999), con algunas modificaciones con respecto a la temperatura de hibridación y el volumen de los reactivos empleados.

3.3.6.3.1. Cálculo de la solución de trabajo

En una tabla de Excel (Microsoft Corporation, USA), se ajustaron las concentraciones del *buffer* PCR (DreamTaq™ *Buffer* PCR, Thermo Fisher Scientific, USA), los dNTPs (2.5mM dNTP Mix Invitrogen®, Thermo Fisher Scientific, USA), los *primers* (Eurofins Scientific, Francia) y la *Taq* polimerasa (DreamTaq™ DNA polimerasa, Thermo Fisher Scientific, USA), y se calculó el volumen de cada reactivo empleando un volumen final de 20µL. Para la primera reacción se empleó 2µL del ADN molde y para la segunda reacción 1µL del producto de la primera reacción diluido en agua para PCR libre de nucleasas (UltraPure™ Distilled Water,Thermo Fisher Scientific, USA) a una proporción de 1:500. La diferencia de volumen en ambas reacciones se completó con agua para PCR libre de nucleasas hasta alcanzar el volumen final.

Para la primera reacción se emplearon los *primers* forward PLF y HUF, y el *primer* reverse UNR. De la unión de los *primers* PLF y UNR se obtiene un producto de PCR que corresponde al género *Plasmodium* spp., el tamaño de la banda depende de la especie y solo es visible si la parasitemia es mayor al 3%. De los *primers* HUF y UNR se obtiene un producto que corresponde al hospedero y se emplea como control interno en la primera reacción (Rubio *et al*., 1999).

Para la segunda reacción se empleó el primer Forward PLF y los *primers* Reverse VIR, FAR, MAR y OVR. De la unión de los *primers* PLF y VIR se obtiene un producto que corresponde a *P. vivax.* De los *primers* PLF y FAR se obtiene un producto que corresponde a *P. falciparum.* De PLF y MAR se obtiene un producto que corresponde a *P. malariae*; y de PLF y OVR se obtiene un producto que corresponde a *P. ovale* (Rubio *et al*., 1999). Las secuencias y tamaño esperado de las bandas de cada primer se detallan en el siguiente cuadro (cuadro 2).

Cuadro 2: Primers empleados en la PCR semianidada-múltiple (Rubio *et al*., 1999)

Primer	Secuencia (5´- 3´)	Especificidad	Tamaño (pb)
UNR[1]	GACGGTATCTGATCGTCTTC	Mamíferos	-
HUF[1]	GAGCCGCCTGGATACCGC	Humano	261
PLF[1,2]	AGTGTGTATCAATCGAGTTTC	*Plasmodium* spp.	783-821*
VIR[2]	AGGACTTCCAAGCCGAAGC	*P. vivax*	499
FAR[2]	AGTTCCCCTAGAATAGTTACA	*P. falciparum*	395
MAR[2]	GCCCTCCAATTGCCTTCTG	*P. malariae*	269
OVR[2]	GCATAAGGAATGCAAAGAACAG	*P. ovale*	436

[1] *Primers* que se emplean en la primera reacción de PCR. [2] *Primers* que se emplean en la segunda reacción de PCR. * El tamaño de la banda en la primera reacción de PCR varía según la especie: 783pb para *P. vivax*, 787pb para *P. falciparum*, 821pb para *P. malariae* y 794pb para *P. ovale*, si la parasitemia es menor al 3% no se observa la banda esperada.

3.3.6.3.2. Gradiente de temperatura

Se realizó la gradiente de la temperatura de hibridación de ambas reacciones, con la finalidad de determinar la temperatura más adecuada para obtener las bandas de interés bien definidas y dentro del tamaño esperado, empleando un termociclador (Veriti™ 96, Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, USA).

Las condiciones de temperatura para la primera reacción fueron: una denaturación inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C por 60 segundos; 56°, 58°, 60° y 62° C por 60 segundos y 72°C por 90 segundos, y una extensión final de 72°C por 10 minutos; y las condiciones de temperatura para la segunda reacción fueron: una denaturación inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos; 56°, 58°, 60° y 62° C por 60 por 30 segundos, y 72°C por 60 segundos, y una extensión final de 72°C por 10 minutos.

3.3.6.3.3. Condiciones de electroforesis

Para visualizar los productos de PCR se empleó la técnica de electroforesis en un sistema horizontal (Cleaver Scientific, UK), de acuerdo con las indicaciones de la norma técnica del INS (INS, 2003). Para los productos de PCR de la primera reacción se realizó la electroforesis en un gel de agarosa al 1%, a 100 voltios y 100 amperios durante 60 minutos, mientras que, para los productos de PCR de la segunda reacción se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 2%, a 100 voltios y 100 amperios durante 60 minutos. Finalmente, se determinó que la temperatura de hibridación óptima para la primera y la segunda reacción fue de 58°C (Figura 11).

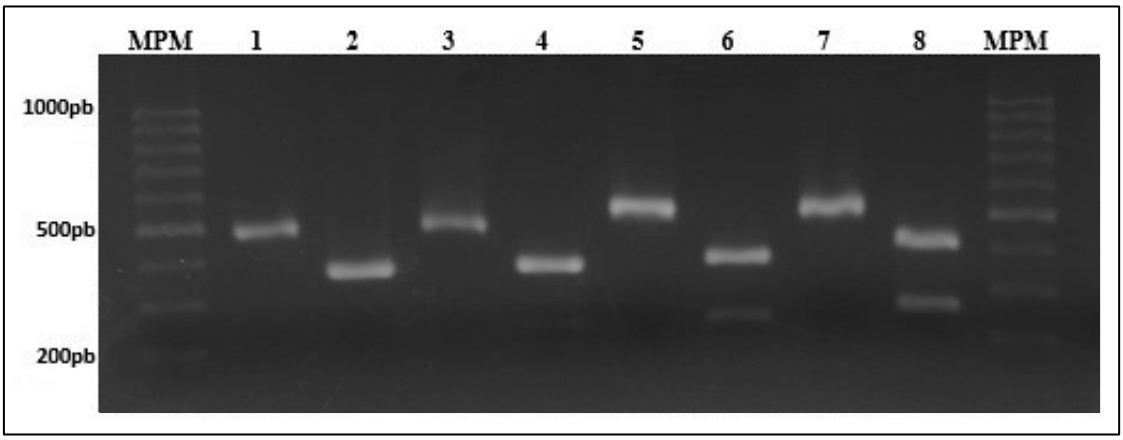


Figura 11: Electroforesis en gel de agarosa al 2% de la gradiente de temperatura
MPM: marcador de peso molecular 100pb; 1, 3, 5 y 7: Control positivo de *P. vivax* a 56, 58, 60 y 62°C respectivamente; 2, 4, 6, y 8: Control positivo de *P. falciparum* a 56, 58, 60 y 62°C respectivamente

3.3.6.4. Aplicación de la PCR semianidada-múltiple

3.3.6.4.1. Primera Reacción

Se empleó *Buffer* PCR (DreamTaq™ *Buffer* PCR, Thermo Fisher Scientific, USA) a una concentración de 1x, 200µM de dNTPs (2.5mM dNTP Mix Invitrogen®, Thermo Fisher Scientific, USA), 0.5µM de los *primers* PLF y UNR, y 0.05µM de HUF (Eurofins Scientific, Francia), 0.2µl de *taq* Polimerasa (DreamTaq™ DNA polimerasa, Thermo Fisher Scientific, USA), 2µl del ADN molde y se completó con agua para PCR libre de nucleasas (UltraPure™ Distilled Water, Thermo Fisher Scientific, USA) hasta un volumen final de 20µL. Las condiciones de temperatura del termociclador (Veriti™ 96 Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, USA) fueron: una denaturación inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C por 60 segundos, 58°C por 60 segundos y 72°C por 90 segundos, y una extensión final de 72°C por 10 minutos.

3.3.6.4.2. Segunda Reacción

Se empleó *buffer* PCR (DreamTaq™ *Buffer* PCR, Thermo Fisher Scientific, USA) a 1x, 200µM de dNTPs (2.5mM dNTP Mix Invitrogen®, Thermo Fisher Scientific, USA), 1µM de PLF, 0.1µM de VIR, 0.6µM de FAR, 0.125µM de MAR y 0.25µM de OVR (Eurofins Scientific, Francia), 0.2µl de *taq* Polimerasa (DreamTaq™ Polimerasa, Thermo Fisher Scientific, USA), 1µl del producto de la primera reacción diluido en agua para PCR libre de nucleasas (UltraPure™ Distilled Water, Thermo Fisher Scientific, USA) en una proporción de 1:500, y se completó con agua para PCR libre de nucleasas (UltraPure™ Distilled Water, Thermo Fisher Scientific, USA) hasta un volumen de 20µL. Las condiciones del termociclador (Veriti™ 96, Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, USA) fueron: una denaturación inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos y 72°C por 60 segundos, y una extensión final de 72°C por 10 minutos.

3.3.6.4.3. Electroforesis

Se realizo una electroforesis en gel de agarosa al 2% disuelto en *buffer* TBE a 0.5x empleando un sistema horizontal (Cleaver Scientific, UK), programado a 100 voltios y 100 amperios durante un periodo de 60 minutos. Los resultados obtenidos fueron registrados en una tabla de Excel (Microsoft Corporation, USA) para ser analizados posteriormente.

3.3.7. Análisis de la información

3.3.7.1. Cálculo de la frecuencia de animales positivos

La proporción de animales que fueron detectados como positivos, mediante las técnicas de microscopía y molecular respectivamente, se determinaron en base a la fórmula descrita por Daniel y Cros (2013), mediante el lenguaje de programación R v4.2.0, a través del programa RStudio v2022.02.2-485:

$$P = \frac{N° \; animales \; positivos \; x \; 100}{n}$$

Donde:

P = Frecuencia de animales positivos

n = Tamaño muestral

3.3.7.2. Cálculo del intervalo de confianza

El intervalo de confianza al 90% de cada frecuencia observada se determinó en base a la fórmula descrita por Daniel y Cros (2013), empleando la función "prop.test" del lenguaje de programación R v4.2.0 a través del programa RStudio v2022.02.2-485:

$$IC = P \pm \sqrt[z]{pq/n}$$

Donde:

P = Frecuencia de animales positivos

$q = 1 - p$

z = Valor de z para el nivel de confianza (90%)

n = Tamaño muestral

IV. RESULTADOS

4.1. Identificación Microscópica

El 21.33% (16/75) de los PNH empleados en este estudio fueron detectados como animales positivos a *Plasmodium* spp. mediante las técnicas de microscopía (Gota gruesa y frotis sanguíneo). Todas las muestras positivas fueron identificadas como infecciones por *P. vivax*. Los estadíos sanguíneos más observados fueron trofozoítos inmaduros (Figura 12A) y esquizontes (Figura 12B). La frecuencia de animales positivos expresada en porcentaje, con un nivel de confianza del 90%, de acuerdo con la especie del hospedero se detallan en el cuadro 3.

Cuadro 3: Frecuencia de PNH infectados con *Plasmodium* spp. (*P. vivax*) detectados mediante microscopía (n=75)

		Plasmodium spp. (*P. vivax*)	
		Positivos [4]	$IC_{90\%}$
Hospedero	*Saimiri boliviensis* [1]	33.33 (8/24)	18.27 - 52.19
	Saguinus labiatus [2]	4.76 (1/21)	0.33 - 22.02
	Saguinus mystax [3]	23.33 (7/30)	11.93 - 39.69
Total		21.33 (16/75)	14.06 - 30.77

[1] Especímenes procedentes de la Isla Iquitos. [2] Especímenes procedentes de la Isla Muyuy. [3] Especímenes procedentes de Padre Isla. [4] La fracción entre paréntesis representa el número de animales infectados sobre el número de muestra del estrato.

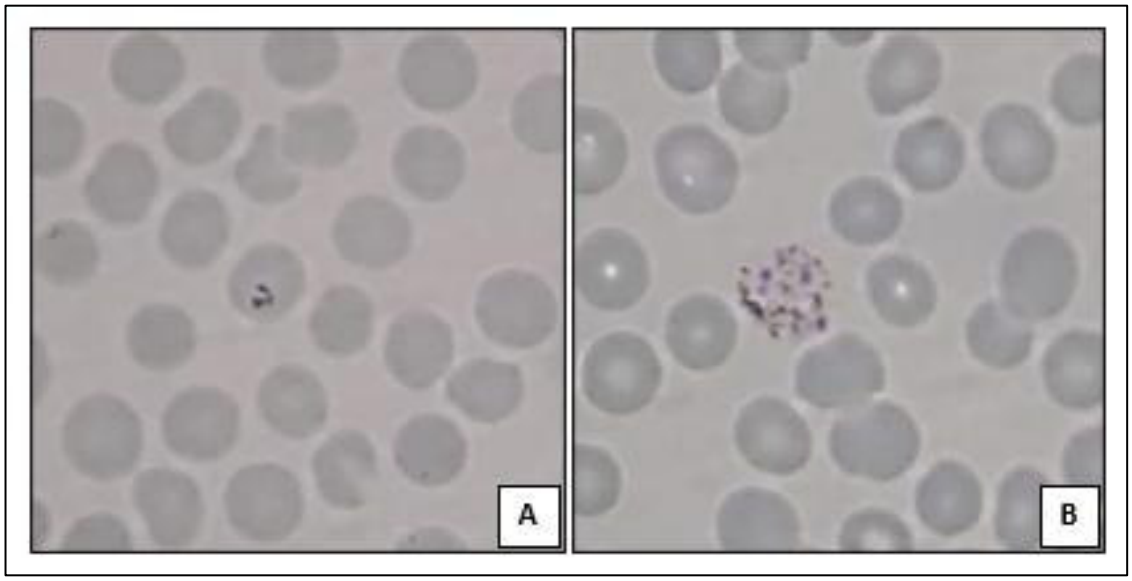


Figura 12: Estadíos sanguíneos de *P. vivax* observado con microscopio óptico a 100x **(A)** Trofozoíto inmaduro en forma de anillo **(B)** Esquizonte con merozoitos en su interior

4.2. Identificación Molecular

El 69.33% (52/75) de los PNH fueron detectados como animales positivos a *Plasmodium* spp. mediante la técnica de PCR semianidada-múltiple en base al gen 18S de la subunidad pequeña del ARN ribosómico. El cuadro 4 detalla la frecuencia de animales positivos expresada en porcentaje, con un nivel de confianza del 90%, de acuerdo con la especie del hospedero.

Cuadro 4: Frecuencia de PNH infectados con *Plasmodium* spp. detectados mediante PCR semianidada-múltiple (n=75)

		Plasmodium spp.	
		Positivos [4]	$IC_{90\%}$
Hospedero	*Saimiri boliviensis* [1]	62.50 (15/24)	46.76 - 78.40
	Saguinus labiatus [2]	76.19 (16/21)	55.99 - 89.55
	Saguinus mystax [3]	70.00 (21/30)	53.35 - 82.96
Total		69.33 (52/75)	59.34 - 77.88

[1] Especímenes procedentes de la Isla Iquitos. [2] Especímenes procedentes de la Isla Muyuy. [3] Especímenes procedentes de Padre Isla. [4] La fracción entre paréntesis representa el número de animales infectados sobre el número de muestra del estrato.

Con respecto a la identificación de las especies de *Plasmodium*, se identificaron los fragmentos amplificados de *P. vivax/simium*, *P. falciparum* y *P. malariae/brasilianum* (Figura 13). El 17.33% (13/75) de los PNH fueron positivos a *P. vivax/simium*, mientras que el 4% (3/75) fueron positivos a *P. falciparum* y el 61.33% (46/75) a *P. malariae/brasilianum*. La frecuencia de animales positivos, con un nivel de confianza del 90%, para cada especie de *Plasmodium* detectado mediante la prueba molecular de acuerdo con la especie del hospedero se detallan en el cuadro 5.

Además, 13.33% (10/75) de los PNH presentaron coinfecciones, 10.67% (8/75) de las coinfecciones estuvieron asociadas a *P. vivax/simium* con *P. malariae/brasilianum* y 2.67% (2/75) a *P. falciparum* con *P. malariae/brasilianum*. La frecuencia de coinfecciones, con un nivel de confianza del 90%, detectado mediante la prueba molecular de acuerdo con la especie del hospedero se detallan en el cuadro 6.

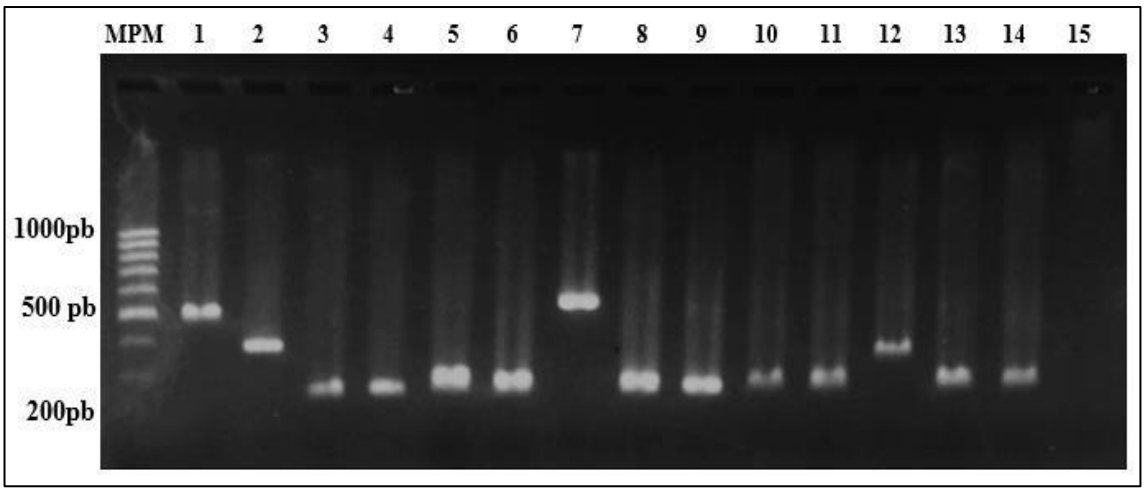


Figura 13: Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de la segunda reacción de la PCR semianidada-múltiple. MPM: marcador de peso molecular de 100pb; 1: Control positivo de *P. vivax*, 2: control positivo de *P. falciparum*; 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 13 y 14: muestra positiva a *P. malariae/brasilianum*, 7: muestra positiva a *P. vivax/simium*; 12: muestra positiva a *P. falciparum*. 15: Control negativo.

Cuadro 5: Frecuencia de PNH infectados con *P. vivax/simium*, *P. falciparum* y *P. malariae/brasilianum* detectados mediante PCR semianidada-múltiple (n=75)

		P. vivax/simium		*P. falciparum*		*P. malariae/brasilianum*	
		Positivos [4]	$IC_{90\%}$	Positivos [4]	$IC_{90\%}$	Positivos [4]	$IC_{90\%}$
Hospedero	*Saimiri boliviensis* [1]	4.17 (1/24)	00.29 – 19.57	4.17 (1/24)	0.29 – 19.57	62.50 (15/24)	46.76 - 78.40
	Saguinus labiatus [2]	14.29 (3/21)	4.48 – 33.62	0.00 (0/21)	0 – 15.30	71.43 (15/21)	51.11 – 86.19
	Saguinus mystax [3]	30.00 (9/30)	17.04 – 46.65	6.67 (2/30)	1.43 – 20.44	53.33 (16/30)	37.16 – 68.90
Total		17.33 (13/75)	10.78 – 26.37	4.00 (3/75)	1.24 – 10.49	61.33 (46/75)	51.17 – 70.65

[1] Especímenes procedentes de la Isla Iquitos. [2] Especímenes procedentes de la Isla Muyuy. [3] Especímenes procedentes de Padre Isla. [4] La fracción entre paréntesis representa el número de animales infectados sobre el número de muestra del estrato.

Cuadro 6: Frecuencia de PNH con coinfecciones de *Plasmodium* spp. detectados mediante PCR semianidada-múltiple (n=75)

		P. vivax/simium + *P. malariae/brasilianum*		*P. falciparum* + *P. malariae/brasilianum*	
		Positivos [4]	$IC_{90\%}$	Positivos [4]	$IC_{90\%}$
Hospedero	*Saimiri boliviensis* [1]	4.17 (1/24)	00.29 – 19.57	4.17 (1/24)	00.29 – 19.57
	Saguinus labiatus [2]	9.52 (2/21)	2.05 – 28.03	0 (0/21)	0 – 15.30
	Saguinus mystax [3]	16.67 (5/30)	7.22 – 32.39	3.33 (1/30)	0.23 – 16.01
Total		10.67 (8/75)	5.62 – 18.75	2.67 (2/75)	0.57 – 8.68

[1] Especímenes procedentes de la Isla Iquitos. [2] Especímenes procedentes de la Isla Muyuy. [3] Especímenes procedentes de Padre Isla. [4] La fracción entre paréntesis representa el número de animales infectados sobre el número de muestra del estrato.

V. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio proporcionan una fuerte evidencia de que los PNH que viven en condiciones de semicautiverio en las islas Iquitos, Muyuy y Padre Isla, de la Cuenca Amazónica Peruana, se encuentran infectados naturalmente con *Plasmodium* spp. Varios autores han reportado previamente la presencia de primates infectados con *Plasmodium* spp. que habitan en los bosques tropicales de diferentes regiones de la Amazonía; sin embargo, estos hallazgos difieren entre sí. En Brasil, Figueiredo *et al*. (2017) detectaron *Plasmodium* spp. en el 29.81% (48/161) de los PNH del noreste de la Amazonía Brasileña, mientras que Silva *et al*. (2019) solo hallaron una frecuencia del 6.12% (6/98) en los primates del noroeste la Amazonía Brasileña; Paralelamente, Rondón *et al*. (2019) detectaron *Plasmodium* spp. en el 12.05% (22/166) de los PNH de los bosques fragmentados de la Amazonía Colombiana, y recientemente, Carrillo-Bilbao *et al*. (2021) reportaron *Plasmodium* spp. en el 3.85% (1/26) de los primates de la Amazonía Occidental Ecuatoriana. No obstante, todos estos hallazgos, incluyendo los resultados de este estudio, sugieren que la infección por *Plasmodium* spp. es común entre los PNH que habitan en la Amazonía y que estos parásitos utilizan varias especies de primates como hospederos.

Además, en este estudio se encontró una discrepancia del 48% entre la frecuencia de PNH infectados con *Plasmodium* spp. que fueron detectados como positivos mediante las técnicas de microscopía y la PCR semianidada-múltiple respectivamente. Cabe mencionar que las técnicas de microscopía son técnicas clásicas y ampliamente utilizadas para la detección de *Plasmodium* spp.; sin embargo, puede tener baja sensibilidad, especialmente en muestras que presentan bajos niveles de parasitemia. En contraste, las

técnicas de PCR son altamente sensibles y específicas cuando se emplean para la detección de *Plasmodium* spp. incluso en muestras con bajos niveles de parasitemia (Rougemont *et al*., 2004). En humanos, se ha demostrado que para que una muestra de sangre sea detectada como positiva mediante microscopía se necesitan entre 50 a 100 parásitos/µL de sangre; sin embargo, para que sea detectada mediante PCR solo se necesitan de 1 a 5 parásitos/µL de sangre (Hawkes y Kain, 2007). Por otro lado, en PNH, un estudio realizado en 214 monos de la Amazonía Guyanesa detectó mediante microscopía que el 5.6% estaban infectados con *Plasmodium* spp., mientras que el 11.3% fueron detectados como positivos mediante PCR anidada, concluyendo que la PCR es más sensible que la microscopía para detectar *Plasmodium* spp. en primates con bajos niveles de parasitemia (Fandeur *et al*., 2000). Los resultados de este estudio concuerdan y respaldan esta afirmación.

Con respecto a la identificación de las especies de *Plasmodium*, solo se pudo identificar a *P. vivax* mediante la microscopia. La identificación correcta de la especie causante de la infección es muy importante porque repercute en el diagnóstico definitivo y en la elección del tratamiento más adecuado; sin embargo, varios estudios han demostrado que los bajos niveles de parasitemia, así como la falta de experiencia del microscopista, pueden dificultar el diagnóstico y la identificación correcta de las especies de *Plasmodium* mediante esta técnica, porque las formas jóvenes de los trofozoítos son muy parecidas (Tangpukdee *et al*., 2009). Además, *P. vivax* y *P. malariae* son morfológicamente similares a *P. simium* y *P. brasilianum* respectivamente (Coatney *et al*., 2003). Adicionalmente, la forma de anillo de *P. malariae* también se puede identificar erróneamente como *P. vivax*, debido a que la forma de anillo de las dos especies es muy similar (Deane, 1977). Esto podría explicar por qué algunas de las muestras de este estudio que fueron identificadas como *P. vivax* mediante microscopía, resultaron positivas a *P. malariae* mediante PCR semianidada-múltiple.

En contraste, se identificaron tres especies de *Plasmodium* mediante la técnica de PCR semianidada-múltiple empleada. Esta técnica ha sido diseñada para detectar las cuatro especies de *Plasmodium* causantes de malaria humana en base al gen codificante de la subunidad 18S del ARN ribosómico (Rubio *et al*., 1999), y ha sido utilizada ampliamente por diferentes autores para detectar e identificar estas especies de parásitos tanto en humanos (Toapanta, 2019), como en PNH (De Castro-Duarte *et al.*, 2008;

Figueiredo *et al*., 2017; Rondón *et al*., 2019; Silva *et al*., 2019) y vectores (Lardeux *et al*., 2008). Además, un estudio *in vitro* comparó esta técnica con una PCR-anidada y una PCR-múltiple empleando diluciones seriadas de 40parasitos/µl obteniendo resultados positivos hasta con 0.4 parásitos/µL para *P. vivax* y *P. falciparum*, 0.04 parásitos/µL para *P. malariae* y 4 parásitos/µL para *P. ovale*, demostrando así su elevada sensibilidad y especificidad (Mixson-Hayden, 2010).

Sin embargo, es importante tener en cuenta que la identificación de las especies de *Plasmodium* mediante las técnicas de PCR en base al gen 18S del ARN ribosómico también podrían presentar limitaciones, especialmente en regiones como la Amazonía, donde coexisten especies de *Plasmodium* genéticamente similares (Fuehrer *et al*. 2022). Dos estudios previos han reportado que *P. vivax* y *P. malariae* son genéticamente similares a *P. simium* y *P. brasilianum* respectivamente (Antinori *et al*., 2021). El primer estudio, realizado en primates de la selva tropical de Guayana Francesa, analizó las secuencias genómicas de *P. malariae* y *P. brasilianum*, concluyendo que ambos parásitos se encuentran estrechamente relacionados a nivel genético (Fandeur *et al*., 2000). Por otro lado, el segundo estudio comparó las secuencias de 24 cepas de *P. vivax* y dos cepas de *P. simium*, concluyendo que estas especies son genéticamente parecidas (Lim *et al*., 2005). Por tal motivo, algunos autores que han realizado estudios de vigilancia de *Plasmodium* spp. en PNH empleando estas técnicas de PCR en regiones amazónicas donde cohabitan estas especies, han reportado cautelosamente sus hallazgos como *P. vivax/simium* y *P. malariae/brasilianum* (Buery *et al*., 2017; Figueiredo *et al*., 2017; Fuentes-Ramírez *et al*., 2017; Rondón *et al*., 2019). Los parásitos identificados en este estudio también se han reportado de la misma manera.

La presencia de *P. vivax/simium* en el 17.33% (13/75) de los primates evaluados en este estudio es mayor que los reportes recientes publicados por otros autores. Rondón *et al*. (2019) detectaron una frecuencia del 6.02% (10/166) de PNH infectados en los bosques fragmentados de la Amazonía de Colombia, mientras que Silva *et al*. (2019) detectaron solamente el 2.04% (2/98) de PNH infectados de la región de Manaos, en la Amazonía occidental de Brasil. Además, un estudio de vigilancia epidemiológica realizado en humanos detectó *P. simium* mediante técnicas moleculares en muestras colectadas durante un brote de malaria humana en la mata atlántica de Rio de Janeiro, en Brasil, concluyendo que esta especie podría estar circulando naturalmente entre los

pobladores de la región, diagnosticado erróneamente como *P. vivax* debido a la falta de diagnósticos moleculares de rutina (Brasil *et al*., 2017). Este hallazgo resulta preocupante debido a que *P. vivax* es la especie causante de malaria humana más frecuente que ha sido registrada históricamente en nuestro país, especialmente en las localidades de la región de Loreto (Rosas-Aguirre *et al*, 2016), lo que sugiere que podría existir riesgo potencial de transmisión zoonótica.

Paralelamente, el hallazgo de *P. falciparum* en el 4% (3/75) de estos primates también resulta preocupante debido a que esta especie es responsable de más del 90% de las muertes por malaria en humanos a nivel mundial (OMS, 2022). Además, esta frecuencia es similar a los hallazgos de otros autores. Silva *et al*. (2019) reportaron una frecuencia del 4.08 % (4/98) en PNH de Manaos, en Brasil; Rondón *et al*. (2019), una frecuencia del 4.3% (1/23) y 9% (1/11) en *A. seniculus* de los bosques fragmentados de la Amazonía de Colombia; y, recientemente, Carrillo-Bilbao *et al*. (2021), una frecuencia del 3.85% (1/26) en *Leontocebus lagonotus/Saguinus lagonotus* de la Amazonía Occidental de Ecuador. Esto sugiere que existe un proceso de adaptación del parásito a las diferentes especies de PNH de la Amazonía, lo que podría tener implicancias importantes en la conservación de estas especies (Rondón *et al*., 2019).

Por otro lado, la presencia de *P. malariae/brasilianum* en el 61.33% (46/75) de los PNH evaluados difiere con los reportes de los otros autores. De Castro-Duarte *et al*. (2008) reportaron que solo el 5.5% y 5.6% de *A. caraya* y *A. clamitans* de Brasil estaban infectados; mientras que, Fuentes-Ramírez *et al*. (2017) reportaron que el 3.3% (5/152) de primates en cautiverio del sur de Costa Rica estaban infectados. No obstante, recientemente, Figueiredo *et al*. (2017) reportaron que el 97.92% (47/48) de los PNH del noreste de la Amazonía de Brasil estaban infectados. Es probable que la distribución de *P. malariae/brasilianum* en PNH este influenciada por varios factores como el clima local, la presencia de vectores competentes y el tamaño y densidad de la población de los hospederos (Faust y Dobson, 2015). Se ha demostrado que la tasa de infección de *Plasmodium* spp. en PNH se incrementa con el peso corporal promedio y el tamaño de grupo, debido a una mayor producción de olores que atraen a los vectores de los parásitos de la malaria (Daviews *et al*., 1991).

Adicionalmente, el 13.33% (10/75) de los PNH presentaron coinfecciones, de las cuales, el 10.67% (8/75) estuvieron asociadas a *P. vivax/simium* con *P. malariae/brasilianum* y el 2.67% (2/75) a *P. falciparum* con *P. malariae/brasilianum*. En Brasil se han reportado coinfecciones asociadas a *P. brasilianum* con *P. simium* en el 3.33% (1/30) de PNH mantenidos en cautiverio (de Alvarenga *et al*., 2015), y en Colombia, también se han reportado coinfecciones asociadas a *P. vivax/simium* con *P. malariae/brasilianum* en el 11.11% (2/18) de *A. hybridus* y el 20% (1/5) de *A. seniculus* de los bosques fragmentados (Rondón *et al*., 2019). Estos reportes son importantes porque demuestran que los primates de la Amazonía pueden ser hospederos de más de una especie de *Plasmodium* y sugieren que podrían estar contribuyendo como reservorios en el ciclo de la malaria potencialmente zoonótica (De Castro-Duarte, 2008).

El hallazgo de *P. vivax/simium* y *P. malariae/brasilianum* en los especímenes de *S. mystax*, *S. labiatus* y *S. boliviensis*; así como de *P. falciparum* en los especímenes de *S. mystax* y *S. boliviensis* evaluados en este estudio constituyen el primer reporte de infección natural detectado mediante pruebas microscópicas y moleculares a la vez en estas especies de primates. Además, ninguno de los animales que fueron detectados como positivos presentaron signos clínicos compatibles con malaria, a pesar de estar infectados en el momento de la toma de muestra. Esto refuerza la hipótesis de que los PNH de la Amazonía podrían estar actuando como reservorios de *Plasmodium* spp. El proceso de expansión de las áreas urbano-rurales y el cambio del uso de la tierra en los bosques tropicales de la Amazonía, debido al crecimiento demográfico y al incremento de actividades antropogénicas como la agricultura, ganadería, tala y minería, podrían incrementar la exposición a los vectores que se alimentan de estos primates, y el riesgo de transmisión potencial de *Plasmodium* spp. (De Alvarenga *et al*., 2018).

Sin embargo, se requieren estudios adicionales para confirmar si estos PNH son reservorios potenciales de *Plasmodium*, como la identificación de los posibles vectores y sus patrones de alimentación, estudios de transmisión experimentales, estudios epidemiológicos longitudinales y análisis filogenéticos (Haydon *et al*. 2002). Un estudio realizado en la región del bosque atlántico de Sao Paulo, Brasil, donde más del 60% de los monos aulladores (*A. guariba*) están endémicamente infectados, demostró que las hembras infectadas de mosquitos del género *Anopheles (Kerteszia) cruzii*, vector de *P. brasilianum* y *P. simium*, también pueden transmitir estos parásitos al hombre (Deane,

1977). Por lo tanto, es importante identificar los vectores que intervienen en el ciclo de la malaria de los PNH con humanos que habitan en esta región, y determinar el rango de hospederos de los que se alimentan para esclarecer si existen las condiciones ecológicas necesarias para que se lleve a cabo la transmisión zoonótica.

Finalmente, se deben emplear técnicas de secuenciación de ADN para confirmar si las infecciones de los PNH son causadas por *P. vivax* o *P. simium*, y *P. malariae* o *P. brasilianum*; y realizar el análisis filogenético de las secuencias, a fin de comprender mejor el parentesco que tienen las cepas de *Plasmodium* que infectan a PNH con las cepas humanas. Llenar este vacío de información podría ayudar a comprender mejor el rol que cumplen los PNH de esta región en la dinámica del ciclo biológico de la malaria y, en consecuencia, contribuir con los programas de control y prevención de la enfermedad para garantizar la salud de las comunidades locales que cohabitan con primates en la interfaz humano-PNH en la Amazonía Peruana.

VI. CONCLUSIONES

- El 21.33% (16/75) y 69.33% (52/75) de los PNH están infectados con *Plasmodium* spp., según la técnica de microscopía y PCR semianidada-múltiple respectivamente.

- *S. mystax* y *S. boliviensis* son hospederos de *P. vivax/simium*, *P. falciparum* y *P. malariae/brasilianum*, y *S. labiatus* de *P. vivax/simium* y *P. malariae/brasilianum*.

- *P. vivax/simium* y *P. malariae/brasilianum* infectan naturalmente a *S. mystax*, *S. labiatus* y *S. boliviensis*, y *P. falciparum* a *S. mystax* y *S. boliviensis.*

VII. RECOMENDACIONES

- Secuenciar las muestras positivas a la PCR semianidada-múltiple y compararlas con las secuencias de *Plasmodium* que infectan a humanos en la región para confirmar si pertenecen al mismo linaje.

- Identificar los vectores que cohabitan con el hombre y PNH, así como el rango de hospederos de los que se alimentan, para esclarecer si existen las condiciones ecológicas para la transmisión zoonótica.

- Emplear esta información en la implementación de futuras estrategias de control y prevención de la malaria, así como en las políticas, planes de manejo y conservación de PNH a fin de disminuir los riesgos potenciales de transmisión zoonótica.

VIII. LITERATURA CITADA

1. ***Acha P, Boris S. 2003.*** Malaria de los primates no humanos. CIE-10 B53.1 Paludismo debido a plasmodio de los simios. En: Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales, Volumen III: Parasitosis. 3ª ed. Washington DC: OPS, publicación científica N° 503. p 73-79.

2. ***Alfonso J. 2014.*** Evaluación de tres protocolos de contención química reversible en monos nocturnos (*Aotus vociferans*) en Cautiverio. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 110 p.

3. ***Antinori S, Bonazzetti C, Giacomelli A, Corbellino M, Galli M, Parravicini C, Ridolfo AL. 2021.*** Non-human primate and human malaria: past, present and future. J Travel Med. Jul 7; 28(5): taab036. DOI: 10.1093/jtm/taab036

4. ***Ashley EA, Pyae Phyo A, Woodrow CJ. 2018.*** Malaria. Lancet. Apr 21;391(10130):1608-1621. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)30324-6

5. ***Buchanan-Smith H. 1990.*** Polyspecific association of two tamarin species, *Saguinus labiatus* and *Saguinus fuscicollis*, in Bolivia. Am J Primatol. 22(3): 205-214. DOI: 10.1002/ajp.1350220306

6. ***Brasil P, Zalis MG, de Pina-Costa A, Siqueira AM, Júnior CB, Silva S, Areas ALL, Pelajo-Machado M, de Alvarenga DAM, da Silva Santelli ACF, Albuquerque HG, Cravo P, Santos de Abreu FV, Peterka CL, Zanini GM, Suárez Mutis MC, Pissinatti A, Lourenço-de-Oliveira R, de Brito CFA, de Fátima Ferreira-da-Cruz M, Culleton R, Daniel-Ribeiro CT. 2017.*** Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium*

simium in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. Lancet Glob Health. Oct;5(10): e1038-e1046. DOI: 10.1016/S2214-109X(17)30333-9

7. ***Buery JC, Rodrigues PT, Natal L, Salla LC, Loss AC, Vicente CR, Rezende HR, Duarte AMRC, Fux B, Malafronte RDS, Falqueto A, Cerutti C Jr. 2017.*** Mitochondrial genome of *Plasmodium vivax/simium* detected in an endemic region for malaria in the Atlantic Forest of Espírito Santo state, Brazil: do mosquitoes, simians and humans harbour the same parasite? Malar J. Oct 30;16(1):437. DOI: 10.1186/s12936-017-2080-9

8. ***Carrillo-Bilbao GA, Navarro JC, Garigliany MM, Martin-Solano S, Minda E, Benítez-Ortiz W, Saegerman C. 2021.*** Molecular Identification of *Plasmodium falciparum* from Captive Non-Human Primates in the Western Amazon Ecuador. Pathogens. Jun 22;10(7):791. DOI: 10.3390/pathogens10070791

9. ***[CDC-Perú] Centro Nacional de Epidemiología, Control y Prevención de Enfermedades del Ministerio de Salud del Perú. 2022a.*** Alerta epidemiológica. Incremento de casos y ocurrencia de brotes por malaria a nivel nacional. Código AE018-2022. Lima: CDC-Perú. Informe técnico. 2p

10. ***[CDC-Perú] Centro Nacional de Epidemiología, Control y Prevención de Enfermedades del Ministerio de Salud del Perú. 2022b.*** Boletín epidemiológico Volumen 31-SE 52 Semana epidemiológica (del 25 al 31 de diciembre 2022). Lima: CDC-Perú. Informe técnico. p: 2129.

11. ***Coatney GR, Collins WE, Warren M, Contacos PG. 2003.*** The primate malarias. 1st ed. Bethesda, MD: US National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Digital Version 1.0. Atlanta, GA: CDC.

12. ***Cornejo D. 2015.*** Evaluación de tres protocolos de inmovilización química reversible empleando ketamina, xilacina y midazolam en primates del género *Saguinus spp*. mantenidos en cautiverio. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 82 p.

13. ***Daniel y Cross. 2013.*** Determination of Sample Size for Estimating Proportions. En: Biostatistics: a foundation for analysis in the health sciences, 10th edition. Ed. Wiley. p. 171 – 172.

14. ***Daviews CR, Ayres JM, Dye C, Deane LM. 1991.*** Malaria Infection Rate of Amazonian Primates Increases with Body Weight and Group Size. Functional Ecology, 5(5), 655–662. DOI: 10.2307/2389485

15. ***de Abreu FVS, Gomes LR, Mello ARL, Bianco-Júnior C, de Pina-Costa A, Dos Santos E, Teixeira DS, Brasil P, Daniel-Ribeiro CT, Lourenço-de-Oliveira R, de Fátima Ferreira-da-Cruz M. 2018.*** Frozen blood clots can be used for the diagnosis of distinct *Plasmodium* species in man and non-human primates from the Brazilian Atlantic Forest. Malar J. Sep 24;17(1):338. DOI: 10.1186/s12936-018-2485-0

16. ***Duarte AM, Malafronte Rdos S, Cerutti C Jr, Curado I, de Paiva BR, Maeda AY, Yamasaki T, Summa ME, Neves Ddo V, de Oliveira SG, Gomes Ade C. 2008.*** Natural *Plasmodium* infections in Brazilian wild monkeys: reservoirs for human infections? Acta Trop. Aug;107(2):179-85. DOI: 10.1016/j.actatropica.2008.05.020

17. ***de Alvarenga DAM, de Pina-Costa A, de Sousa TN, Pissinatti A, Zalis MG, Suaréz-Mutis MC, Lourenço-de-Oliveira R, Brasil P, Daniel-Ribeiro CT, de Brito CF. 2015.*** Simian malaria in the Brazilian Atlantic forest: first description of natural infection of capuchin monkeys (Cebinae subfamily) by *Plasmodium simium*. Malar J. Feb 18; 14:81. DOI: 10.1186/s12936-015-0606-6

18. ***de Alvarenga DAM, Culleton R, de Pina-Costa A, Rodrigues DF, Bianco C Jr, Silva S, Nunes AJD, de Souza JC Jr, Hirano ZMB, Moreira SB, Pissinatti A, de Abreu FVS, Lisboa Areas AL, Lourenço-de-Oliveira R, Zalis MG, Ferreira-da-Cruz MF, Brasil P, Daniel-Ribeiro CT, de Brito CFA. 2018.*** An assay for the identification of *Plasmodium simium* infection for diagnosis of zoonotic malaria in the Brazilian Atlantic Forest. Sci Rep. Jan 8;8(1):86. DOI: 10.1038/s41598-017-18216-x

19. ***Deane L. 1977.*** Epidemiología de la malaria símica en el continente americano. En: Primera Conferencia Interamericana sobre la Conservación y Utilización de Primates

Americanos no Humanos en las Investigaciones Biomédicas. Washington D.C. Organización Panamericana de la Salud (Publicación científica N° 317). p: 153-172.

20. ***Di Gennaro F, Marotta C, Locantore P, Pizzol D, Putoto G. 2020.*** Malaria and COVID-19: Common and Different Findings. Trop Med Infect Dis. Sep 6;5(3):141. DOI: 10.3390/tropicalmed5030141

21. ***Dunn FL, Lambrecht FL. 1963.*** The hosts of *Plasmodium brasilianum* Gonder and von Berenberg-Gossler, 1908. The Journal of Parasitology, 316-319. DOI: 10.2307/3276004

22. ***Encarnación F, Moya L, Soini P, Tapia J, Aquino R. 1990.*** La captura de Callitrichidae (*Saguinus* y *Cebuella*) en la Amazonía Peruana. En: La Primatología en el Perú, Investigaciones Primatológicas 1973-1985, Proyecto Peruano de Primatología. Lima: Ed. San Marcos. p 45-56.

23. ***Erkenswick GA, Watsa M, Pacheco MA, Escalante AA, Parker PG. 2017.*** Chronic *Plasmodium brasilianum* infections in wild Peruvian tamarins. PLoS One. Sep 13;12(9): e0184504. DOI: 10.1371/journal.pone.0184504

24. ***Escalante AA, Cepeda AS, Pacheco MA. 2022.*** Why *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* are so different? A tale of two clades and their species diversities. Malar J. May 3;21(1):139. DOI: 10.1186/s12936-022-04130-9

25. ***Fandeur T, Volney B, Peneau C, de Thoisy B. 2000.*** Monkeys of the rainforest in French Guiana are natural reservoirs for *P. brasilianum/P. malariae* malaria. Parasitology. Jan. 120 (Pt 1): 11-21. DOI: 10.1017/s0031182099005168

26. ***Faust C, Dobson AP. 2015.*** Primate malarias: Diversity, distribution and insights for zoonotic *Plasmodium*. One Health. Oct. 24; 1: 66-75. DOI: 10.1016/j.onehlt.2015.10.001

27. ***Figueiredo MAP, Di Santi SM, Manrique WG, André MR, Machado RZ. 2017.*** Identification of *Plasmodium* spp. in Neotropical primates of Maranhense Amazon in Northeast Brazil. PLoS One. Aug 10; 12(8): e0182905. DOI: 10.1371/journal.pone.0182905

28. ***Fuehrer HP, Campino S, Sutherland CJ. 2022.*** The primate malaria parasites *Plasmodium malariae*, *Plasmodium brasilianum* and *Plasmodium ovale* spp.: genomic insights into distribution, dispersal and host transitions. Malar J. May 3;21(1):138. DOI: 10.1186/s12936-022-04151-4

29. ***Fuentes-Ramírez A, Jiménez-Soto M, Castro R, Romero-Zuñiga JJ, Dolz G. 2017.*** Molecular Detection of *Plasmodium malariae/Plasmodium brasilianum* in Non-Human Primates in Captivity in Costa Rica. PLoS One. Jan 26;12(1): e0170704. DOI: 10.1371/journal.pone.0170704

30. ***Guerra RI, Ore M, Valdivia HO, Bishop DK, Ramos M, Mores CN, Campbell WR. 2019.*** A cluster of the first reported *Plasmodium ovale* spp. infections in Peru occuring among returning UN peace-keepers, a review of epidemiology, prevention and diagnostic challenges in nonendemic regions. Malar J. May 22;18(1):176. DOI: 10.1186/s12936-019-2809-8

31. ***Gozalo A. 1985.*** Aspectos clínicos de la asociación de los Clorhidratos de Ketamina y Xilacina en el *Aotus* sp. (Musmuqui o Mono Nocturno). Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos, Lima, Perú. 36 p.

32. ***Gozalo A, Lucas C, Cachay M, Montoya E, Ballou WR, Wooster MT, Watts DM. 1997.*** Prevalence of antibody to *Plasmodium falciparum* antigens among feral *Saimiri* monkeys in the Amazon basin region of Peru. J Med Primatol. Aug;26(4):204-6. DOI: 10.1111/j.1600-0684.1997.tb00053.x

33. ***Haakenstad A, Harle AC, Tsakalos G, Micah AE, Tao T, Anjomshoa M, Cohen J, Fullman N, Hay SI, Mestrovic T, Mohammed S, Mousavi SM, Nixon MR, Pigott D, Tran K, Murray CJL, Dieleman JL. 2019.*** Tracking spending on malaria by source in 106 countries, 2000-16: an economic modelling study. Lancet Infect Dis. Jul;19(7):703-716. DOI: 10.1016/S1473-3099(19)30165-3

34. ***Hawkes M, Kain KC. 2007.*** Advances in malaria diagnosis. Expert Rev Anti Infect Ther. Jun;5(3):485-95. DOI: 10.1586/14787210.5.3.485

35. ***Haydon DT, Cleaveland S, Taylor LH, Laurenson MK. 2002.*** Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. Emerg Infect Dis. Dec;8(12):1468-73. DOI: 10.3201/eid0812.010317

36. ***Hershkovitz P. 1984.*** Taxonomy of squirrel monkeys genus *Saimiri* (cebidae, platyrrhini): A preliminary report with description of a hitherto unnamed form. Am J Primatol. 6(4):257-312. DOI: 10.1002/ajp.1350060402

37. ***Heymann EW, Ganzhorn JU. 2015.*** History of primate behavioural and ecological field research at the German Primate Center. Primate Biology, 2(1), 73-80. DOI: 10.5194/pb-2-73-2015

38. ***Heymann EW. 2022.*** *Saguinus mystax* (Primates: Callitrichidae). Mammalian Species, 54(1024), seac009. DOI: doi.org/10.1093/mspecies/seac009

39. ***Howes RE, Battle KE, Mendis KN, Smith DL, Cibulskis RE, Baird JK, Hay SI. 2016.*** Global Epidemiology of Plasmodium vivax. Am J Trop Med Hyg. Dec 28;95(6 Suppl):15-34. DOI: 10.4269/ajtmh.16-0141

40. ***Hussein MIH, Albashir AAD, Elawad OAMA, Homeida A. 2020.*** Malaria and COVID-19: unmasking their ties. Malar J. Dec 23;19(1):457. DOI: 10.1186/s12936-020-03541-w

41. ***[INS] Instituto Nacional de Salud. 2003.*** Manual de Procedimientos de Laboratorio para el Diagnóstico de la Malaria. Serie de Normas Técnicas N° 39. Lima: Ministerio de Salud del Perú. 100 p.

42. ***Ique C, Aquino R. 2015.*** Abundancia de primates y de otros animales de caza con énfasis en *Saguinus mystax* y *Saguinus labiatus* en Padre Isla e Isla Muyuy, Loreto, Perú. En: Ciencia Amazónica (Iquitos) 2015; 5(1): 70 – 80. DOI: 10.22386/ca.v5i1.92

43. ***Lardeux F, Tejerina R, Aliaga C, Ursic-Bedoya R, Lowenberger C, Chavez T. 2008.*** Optimization of a semi-nested multiplex PCR to identify *Plasmodium* parasites in wild-caught *Anopheles* in Bolivia, and its application to field epidemiological studies. Trans R Soc Trop Med Hyg. May;102(5):485-92. DOI: 10.1016/j.trstmh.2008.02.006

44. ***Lim CS, Tazi L, Ayala FJ. 2005.*** *Plasmodium vivax*: recent world expansion and genetic identity to *Plasmodium simium*. Proc Natl Acad Sci USA. Oct 25;102(43):15523-8. DOI: 10.1073/pnas.0507413102

45. ***Liu W, Li Y, Learn GH, Rudicell RS, Robertson JD, Keele BF, Ndjango JB, Sanz CM, Morgan DB, Locatelli S, Gonder MK, Kranzusch PJ, Walsh PD, Delaporte E, Mpoudi-Ngole E, Georgiev AV, Muller MN, Shaw GM, Peeters M, Sharp PM, Rayner JC, Hahn BH. 2010.*** Origin of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in gorillas. Nature. Sep 23;467(7314):420-5. DOI: 10.1038/nature09442

46. ***Liu W, Tang Y. 2013.*** *Plasmodium*. En: Molecular Detection of Human Parasitic Pathogens. CRC Press Taylor & Francis Group. 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 3000, New York, USA. p: 203-213

47. ***Liu W, Li Y, Shaw KS, Learn GH, Plenderleith LJ, Malenke JA, Sundararaman SA, Ramirez MA, Crystal PA, Smith AG, Bibollet-Ruche F, Ayouba A, Locatelli S, Esteban A, Mouacha F, Guichet E, Butel C, Ahuka-Mundeke S, Inogwabini BI, Ndjango JB, Speede S, Sanz CM, Morgan DB, Gonder MK, Kranzusch PJ, Walsh PD, Georgiev AV, Muller MN, Piel AK, Stewart FA, Wilson ML, Pusey AE, Cui L, Wang Z, Färnert A, Sutherland CJ, Nolder D, Hart JA, Hart TB, Bertolani P, Gillis A, LeBreton M, Tafon B, Kiyang J, Djoko CF, Schneider BS, Wolfe ND, Mpoudi-Ngole E, Delaporte E, Carter R, Culleton RL, Shaw GM, Rayner JC, Peeters M, Hahn BH, Sharp PM. 2014.*** African origin of the malaria parasite *Plasmodium vivax.* Nat Commun.;5:3346. DOI: 10.1038/ncomms4346

48. ***Longmire JL, Maltbie M, Baker RJ. 1997.*** Use of" lysis buffer" in DNA isolation and its implication for museum collections. Museum of Texas. Tech University, 163, 1–3.

49. ***Lopes GP, Rohe F, Bertuol F, Polo E, Lima IJ, Valsecchi J, Santos TCM, Nash SD, da Silva MNF, Boubli JP, Farias IP, Hrbek T. 2023.*** Taxonomic review of *Saguinus mystax* (Spix, 1823) (Primates, Callitrichidae), and description of a new species. PeerJ. Jan 11;11: e14526. DOI: 10.7717/peerj.14526

50. ***Marczynska B, Peterson DA, Ogden JD, Wolfe LG. 1983.*** Karyotype of *Saguinus labiatus labiatus* (red-bellied marmosets). Folia Primatol (Basel). 40(3):217-26. DOI: 10.1159/000156102

51. ***Maturrano L, M Aguilar J, Krüger P, Chávez J, Rosadio R, Wheeler JC. 2012.*** Optimización de una técnica para la extracción de ADN de heces de vicuña (*Vicugna vicugna mensalis*). Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 23(3), 369-376.

52. ***Mbacham WF, Ayong L, Guewo-Fokeng M, Makoge V. 2019.*** Current Situation of Malaria in Africa. Methods Mol Biol. 2013:29-44. DOI: 10.1007/978-1-4939-9550-9_2

53. ***Miguel-Oteo M, Jiram AI, Ta-Tang TH, Lanza M, Hisam S, Rubio JM. 2017.*** Nested multiplex PCR for identification and detection of human *Plasmodium* species including *Plasmodium knowlesi*. Asian Pac J Trop Med. Mar;10(3):299-304. DOI: 10.1016/j.apjtm.2017.03.014

54. ***Mixson-Hayden T, Lucchi NW, Udhayakumar V. 2010.*** Evaluation of three PCR-based diagnostic assays for detecting mixed *Plasmodium* infection. BMC Res Notes. Mar 31; 3:88. DOI: 10.1186/1756-0500-3-88

55. ***Moody A. 2002.*** Rapid diagnostic tests for malaria parasites. Clin Microbiol Rev. Jan;15(1):66-78. DOI: 10.1128/CMR.15.1.66-78.2002

56. ***Moya L, Ique C, Soini P. 1990.*** Introducción Experimental y Desarrollo de una Población de *Saguinus mystax* en Padre Isla, Iquitos, Perú. En: La Primatología en el Perú, Investigaciones Primatológicas (1973-1985). eds. La Primatología en el Perú. Perú, 1990. p: 526-536.

57. ***Moya L, Ique C, Puertas P, Encarnación F. 2000.*** Liberación de los "Pichico Pecho Anaranjado" (*Saguinus labiatus*) en la Isla de Muyuy. En: La Primatología en el Perú Volumen II: 109-120.

58. ***Ochoa Y. 2018.*** Identificación de especies de *Plasmodium* en base al gen codificante 18S ARNr en muestras de sangre de primates no humanos en cautiverio. Tesis de

Licenciado en Tecnología Médica en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 70 p.

59. ***[OMS] Organización Mundial de la Salud. 2022.*** World malaria report 2022. Ginebra: OMS. Serie de Informes Técnicos. 249 p.

60. ***[OPS] Organización Panamericana de la Salud. 2020.*** Actualización epidemiológica: aumento de malaria en las Américas en el contexto de la pandemia de COVID-19. Washington D.C. 7 p.

61. ***Pacheco V, Graham-Angeles L, Diaz Peña SR, Hurtado CM, Ruelas D, Cervantes Zevallos OK, Serrano Villavicencio JE***. 2021. Lista actualizada de la diversidad de los mamíferos del Perú y una propuesta para su actualización. Rev Peru Biol. 28(4): 9–38. DOI: 10.15381/rpb.v28i4.21019

62. ***Payne D. 1988.*** Use and limitations of light microscopy for diagnosing malaria at the primary health care level. Bulletin of the World Health Organization, 66(5), 621-626.

63. ***Phillips MA, Burrows JN, Manyando C, van Huijsduijnen RH, Van Voorhis WC, Wells TNC. 2017.*** Malaria. Nat Rev Dis Primers. Aug 3;3:17050. DOI: 10.1038/nrdp.2017.50

64. ***Ramasamy R. 2014.*** Zoonotic malaria - global overview and research and policy needs. Front Public Health. 2014 Aug 18; 2:123. DOI: 10.3389/fpubh.2014.00123

65. ***Rondón S, León C, Link A, González C. 2019.*** Prevalence of *Plasmodium* parasites in non-human primates and mosquitoes in areas with different degrees of fragmentation in Colombia. Malar J. Aug 19;18(1):276. DOI: 10.1186/s12936-019-2910-z. PMID: 31426810; PMCID: PMC6700793.

66. ***Rosas-Aguirre A, Gamboa D, Manrique P, Conn JE, Moreno M, Lescano AG, Sanchez JF, Rodriguez H, Silva H, Llanos-Cuentas A, Vinetz JM. 2016.*** Epidemiology of *Plasmodium vivax* Malaria in Peru. Am J Trop Med Hyg. Dec 28;95(6 Suppl):133-144. DOI: 10.4269/ajtmh.16-0268

67. ***Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hinrikson HP, 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. J Clin Microbiol. Dec;42(12):5636-43. DOI: 10.1128/JCM.42.12.5636-5643.2004

68. ***Rubio JM, Benito A, Roche J, Berzosa PJ, García ML, Micó M, Edú M, Alvar J. 1999.*** Semi-nested, multiplex polymerase chain reaction for detection of human malaria parasites and evidence of *Plasmodium vivax* infection in Equatorial Guinea. Am J Trop Med Hyg. 1999 Feb;60(2):183-7. DOI: 10.4269/ajtmh.1999.60.183

69. ***Silva TRM, Barros FNL, Bahia M, Sampaio Junior FD, Santos SSF, Inoue LS, Gonçalves TS, Chiesorin Neto L, Faria DCLO, Tochetto C, Viana GMR, Monteiro FOB, Góes-Cavalcante G, Scofield A. 2019.*** *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infection in Neotropical primates in the western Amazon, Brazil. Zoonoses Public Health. Nov;66(7):798-804. DOI: 10.1111/zph.12626

70. ***Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox-Singh J, Thomas A, Conway DJ. 2004.*** A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. Lancet. Mar 27;363(9414):1017-24. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)15836-4

71. ***Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, Thaithong S, Brown KN. 1993.*** High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. Mol Biochem Parasitol. 61(2): 315–20. DOI: 10.1016/0166-6851(93)90077-B

72. ***Soini P. 1990.*** Resultados de una investigación preliminar de la fauna de la isla Iquitos e islas adyacentes. En: La primatología en el Perú, Volumen I. p 413-441.

73. ***Soulsby EJL. 1987.*** Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. 7ª. Edición. Nueva editorial Interamericana, SA de CV México DF, México. pp: 709-712.

74. ***Stephens J, Owen D. 1927.*** *Plasmodium Ovale*, Annals of Tropical Medicine & Parasitology, 21:2, 293-302, DOI: 10.1080/00034983.1927.11684538

75. ***Ta TH, Hisam S, Lanza M, Jiram AI, Ismail N, Rubio JM. 2014.*** First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*. Malar J. Feb 24; 13:68. DOI: 10.1186/1475-2875-13-68

76. ***Tangpukdee N, Duangdee C, Wilairatana P, Krudsood S. 2009.*** Malaria diagnosis: a brief review. Korean J Parasitol. Jun;47(2):93-102. DOI: 10.3347/kjp.2009.47.2.93

77. ***Tapia J, Aquino R, Encarnación F, Moya L. 1990.*** Métodos y técnicas de atrapamiento de Cébidos (*Saimiri, Aotus* y *Cebus).* En: La Primatología en el Perú, Investigaciones Primatológicas 1973-1985, Proyecto Peruano de Primatología. Lima: Ed. San Marcos. p. 158-162.

78. ***Toapanta A. 2019.*** Detección e identificación molecular de *Plasmodium* spp. en la amazonia ecuatoriana por la técnica de semi-nested multiplex PCR. Trabajo de titulación de Ingeniero en Biotecnología. Quito: Universidad de las Américas, Ecuador.

79. ***Warhurst DC, Williams JE. 1996.*** ACP Broadsheet no 148. July 1996. Laboratory diagnosis of malaria. J Clin Pathol. Jul;49(7):533-8. DOI: 10.1136/jcp.49.7.533

80. ***Zariquiey C. 2014.*** Determinación de presencia de hemoparásitos con potencial zoonótico en primates no humanos en cautiverio de algunas ciudades del Perú. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Universidad Científica del Sur, Perú. 75 p.

81. ***Zawawi A, Alghanmi M, Alsaady I, Gattan H, Zakai H, Couper K. 2020.*** The impact of COVID-19 pandemic on malaria elimination. Parasite Epidemiol Control. 2020 Nov;11: e00187. DOI: 10.1016/j.parepi.2020.e00187

IX. APÉNDICE

Anexo 1: Equipo de protección personal, materiales y equipos empleados

1. Equipo de protección personal (EPP)

1.1. Fase de campo

Mameluco impermeable, reusable y fácilmente desinfectable, gorro, botas de trabajo de jebe y de caña alta, capa de lluvia, guantes de cuero, guantes descartables de látex o nitrilo, cofia, mascarilla N95 o su equivalente, anteojos de protección ocular.

1.2. Fase de laboratorio

Mandil largo descartable o mandil blanco largo reusable y fácilmente desinfectable, guantes de látex o nitrilo descartables, cofia, mascarilla N95 o su equivalente, anteojos de protección ocular, calzado cerrado.

2. Materiales y equipos para la captura de PNH

Alambres, alicates, clavos, martillos, troncos, maderas, mallas de ¼ de pulgada y cocada pequeña, mantas oscuras, sogas y soguillas, carretes de hilos de Nylon N° 14, cebos del género *Musa*, trampa Tipo "*Saguinus*", binoculares, equipo de GPS, carpa, bolsa de dormir (sleeping), bote deslizador con motor fuera de borda, cuaderno de notas de campo, lapiceros.

3. Materiales y equipos para la toma de muestra de sangre de PNH

3.1. Restricción física y química

Mallas de captura tipo "mariposero", clorhidrato de ketamina al 10% (Ketalar®, Pfizer, USA), jeringas de 1mL, alcohol al 70%, algodón hidrofílico, caja contenedora de desechos biológicos peligrosos.

3.2. Toma de muestra

Jeringas de 3mL, tubos estériles con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), agujas de 23Gg por una pulgada, alcohol al 70%, algodón hidrofílico, solución Longmire, una caja contenedora de desechos biológicos peligrosos, caja para transporte de muestras (cooler) con geles refrigerantes en su interior.

4. Materiales y equipos para el análisis microscópico

Microscopio óptico de luz (Carl Zeiss™ Microscopio LED Primo Star HAL, Alemania), tubos microcapilares, láminas portaobjetos, láminas cubreobjetos, tinción Giemsa, guantes de látex o nitrilo descartables, caja de transporte de láminas portaobjetos, caja contenedora de desechos biológicos peligrosos.

5. Materiales y equipos para el análisis molecular

Micropipetas de 10µL, 100µL, 200µL y 1000µL (Eppendorf® Research® plus), tubos estériles libres de nucleasas de 200µL, 600µL, 1.5mL y 2mL, solución de Fenol-Cloroformo, Isopropanol, etanol absoluto, *buffer* de elusión, criobox con capacidad de 100 para conservar las muestras de ADN, 1 o 2 crioboxes con capacidad de 100 para conservar las alícuotas de sangre de PNH y una caja contenedora de desechos biológicos peligrosos, agua para PCR libre de nucleasas, *buffer* para PCR a 10X, desoxirribonucleótidos (dNTPs), *primers* PLF, UNR, HUF, VIR, FAR, MAR y OVR (Macrogen®), *Taq* polimerasa, un rack para microtubos, un rack frío para PCR y un termociclador. Agarosa, *buffer* TBE, una probeta de 100mL, un matraz de 250mL, una balanza analítica, una cuchara para pesar la agarosa, un papel de aluminio, un equipo de electroforesis (Cleaver Scientific runVIEW), un tubo de *safegreen* (Safe-Green™ abm®) un frasco de ladder de ADN de 100pb (Invitrogen™), una caja contenedora de desechos biológicos peligrosos.

6. Materiales y equipos para el análisis de datos

Cuadernos de notas de campo, cuaderno de notas de laboratorio, marcador indeleble, lapicero, corrector, lápiz, borrador, reglas de 20 a 30cm, laptop, impresora, USB de 32GB, mouse inalámbrico, software estadístico R 4.2.2, papel bond, otros materiales que se consideren convenientes.

Anexo 2: Resultados del análisis microscópico y molecular de *Plasmodium* spp. en especímenes de *Saimiri boliviensis* de la isla Iquitos

N°	Código	Sexo	Microscopía		PCR semianidada-múltiple en base al gen 18S del ARNr			
			Gota Gruesa	Frotis	*P. vivax/simium*	*P. falciparum*	*P. malariae/brasilianum*	*P. ovale*
1	II-2	Macho	-	-	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
2	II-3	Macho	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3	II-4	Macho	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
4	II-5	Macho	+	*P. vivax*	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
5	II-6	Hembra	+	*P. vivax*	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
6	II-10	Macho	+	*P. vivax*	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
7	II-12	Macho	-	-	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
8	II-13	Hembra	+	*P. vivax*	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
9	II-14	Hembra	+	*P. vivax*	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
10	II-16	Macho	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
11	II-17	Macho	+	*P. vivax*	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
12	II-19	Macho	-	-	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
13	II-20	Macho	-	-	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
14	II-22	Macho	-	-	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
15	II-23	Hembra	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

16	II-24	Hembra	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
17	II-25	Macho	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
18	II-27	Hembra	+	*P. vivax*	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
19	II-31	Hembra	-	-	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
20	II-32	Hembra	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
21	II-33	Hembra	+	*P. vivax*	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
22	II-34	Macho	-	-	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
23	II-36	Hembra	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
24	II-38	Hembra	-	-	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo

Anexo 3: Resultado del análisis microscópico y molecular de *Plasmodium* spp. en especímenes de *Saguinus labiatus* de la isla Muyuy

N°	Código	Sexo	Microscopía		PCR semianidada-múltiple en base al gen 18S del ARNr			
			Gota Gruesa	Frotis	*P. vivax/simium*	*P. falciparum*	*P. malariae/brasilianum*	*P. ovale*
1	IM-1	Macho	-	-	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
2	IM-2	Macho	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3	IM-4	Hembra	-	-	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
4	IM-5	Macho	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
5	IM-6	Macho	-	-	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
6	IM-7	Hembra	+	*P. vivax*	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
7	IM-8	Macho	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
8	IM-9	Macho	-	-	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
9	IM-10	Hembra	-	-	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
10	IM-11	Macho	-	-	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
11	IM-13	Hembra	-	-	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
12	IM-14	Macho	-	-	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
13	IM-14ª	Macho	-	-	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
14	IM-15	Hembra	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
15	IM-16	Macho	-	-	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo

16	IM-18	Macho	-	-	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
17	IM-19	Macho	-	-	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
18	IM-23	Hembra	-	-	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
19	IM-25	Macho	-	-	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
20	IM-27	Macho	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
21	IM-32	Hembra	-	-	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo

Anexo 4: Resultado del análisis microscópico y molecular de *Plasmodium* spp. en especímenes de *Saguinus mystax* de Padre Isla

N°	Código	Sexo	Microscopía		PCR semianidada-múltiple en base al gen 18S del ARNr			
			Gota Gruesa	Frotis	*P. vivax/simium*	*P. falciparum*	*P. malariae/brasilianum*	*P. ovale*
1	PI-1	Macho	-	-	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
2	PI-2	Hembra	-	-	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
3	PI-3	Hembra	+	*P. vivax*	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
4	PI-4	Macho	-	-	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
5	PI-5	Macho	-	-	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
6	PI-7	Macho	-	-	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
7	PI-8	Macho	-	-	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
8	PI-9	Macho	+	*P. vivax*	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
9	PI-10	Hembra	-	-	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
10	PI-11	Macho	+	*P. vivax*	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
11	PI-13	Hembra	+	*P. vivax*	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
12	PI-16	Hembra	-	-	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
13	PI-17	Hembra	-	-	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
14	PI-18	Macho	-	-	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
15	PI-19	Hembra	-	-	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo

16	PI-20	Macho	+	*P. vivax*	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
17	PI-21	Macho	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
18	PI-22	Hembra	+	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
19	PI-25	Hembra	-	-	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
20	PI-26	Macho	-	-	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
21	PI-27	Hembra	-	-	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
22	PI-28	Macho	-	-	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
23	PI-29	Macho	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
24	PI-30	Macho	+	*P. vivax*	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
25	PI-33	Hembra	-	-	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
26	PI-34	Macho	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
27	PI-35	Hembra	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
28	PI-37	Macho	-	-	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
29	PI-38	Hembra	+	*P. vivax*	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
30	PI-40	Macho	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo