PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Poblaciones de *Plasmodium falciparum*, en las provincias de Esmeraldas y Carchi en 2019 y 2020

Disertación previa a la obtención del título de Microbiólogo

JOSÉ ANDRÉS CARTAGENOVA NOVOA

Quito, 2021

Certifico que la Disertación de Microbiología del Sr. José Andrés Cartagenova Novoa ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dr. Fabián Ernesto Sáenz Calderón
Director de la Disertación
Quito

“¿Por qué esta magnífica tecnología científica, que ahorra trabajo y nos hace la vida más fácil, nos aporta tan poca felicidad? La repuesta es está, simplemente: porque aún no hemos aprendido a usarla con acierto”.

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a mi familia, a mi padre por todo su apoyo y sacrificio que me han permitido llegar tan lejos y ser la persona que soy. A mi hermano mayor y mi madre por su ejemplo y a mi hermano menor por sus palabras de aliento.

A mis amigos, Karla, Michelle, Johanna y Mateo por acompañarme a lo largo de la carrera y enseñarme tanto. A Martín, David, Ana Camila, Christian, Carol y Carmenluz por el soporte y la ayuda brindados.

Al CISeAL, por brindarme todo lo necesario para la realización de esta investigación.

Al Dr. Fabián Sáenz por depositar su confianza en mí y brindarme su tiempo y conocimiento y permitirme trabajar con él.

A todas las personas que me dedicaron su tiempo y apoyo y me ayudaron a crecer como persona.

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN 1

2. ABSTRACT 2

3. INTRODUCCIÓN 3

3.1. GENERALIDADES 3
3.2. SITUACIÓN DE LA MALARIA EN EL MUNDO 3
3.3. MALARIA EN ECUADOR 4
3.4. EL PARÁSITO CAUSANTE DE LA MALARIA, *Plasmodium* 5
3.4.1. CICLO DE VIDA DE *Plasmodium* 5
3.4.2. GENOMA DE *Plasmodium* 6
3.5. VECTOR, MOSQUITO *Anopheles* 7
3.6. SÍNTOMAS DE LA MALARIA 8
3.7. DIAGNOSTICO DE LA MALARIA 9
3.8. TRATAMIENTO 10
3.9. RESISTENCIA A FÁRMACOS 11
3.10. VACUNA CONTRA LA MALARIA 12
3.11. ESTRUCTURA POBLACIONAL DE *Plasmodium falciparum* 13
3.12. OBJETIVOS 17
3.12.1. OBJETIVO GENERAL 17
3.12.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 17

4. MATERIALES Y MÉTODOS 18

4.1. ÉTICA 18
4.2. POBLACIÓN 18
4.3. OBTENCIÓN DE MUESTRAS 21
4.4. EXTRACCIÓN DE ADN 22
4.5. AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES 23
4.5.1. AMPLIFICACIÓN DE LOS MICROSATÉLITES TA1, Poly-α, PfPK2, TA109 Y 2490 24
4.5.2. AMPLIFICACIÓN DE LOS MICROSATÉLITES C2M34 Y C3M69 25
4.6. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE REPETICIONES DE LOS MICROSATÉLITES 26
4.7. ANÁLISIS DEL TAMAÑO DEL TAMAÑO DE FRAGMENTOS 26
4.8. ANÁLISIS DE ESTRUCTURA POBLACIONAL 26

4.8.1. SOFTWARE ARLEQUIN 26
4.8.2. SOFTWARE NETWORK 26
4.8.3. SOFTWARE STRUCTURE.....27
4.8.4. SOFTWARE LIAN 27
4.9. GENERACIÓN DE MAPAS.....27
5. RESULTADOS.....28
5.1. MUESTRAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO.....28
5.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS MICROSATÉLITES 28
5.3. ESTRUCTURA POBLACIONAL DE *P. falciparum* EN ECUADOR EN LOS AÑOS 2019 Y 2020 29
5.3.1. POLIMORFISMO Y HETEROCIGOSIDAD 29
5.3.2. DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO 31
5.3.3. INDICES DE FIJACIÓN.....32
5.3.4. RELACIÓN GENÉTICA ENTRE LOCALIDADES.....32
5.4. COMPARACIÓN DE LAS MUESTRAS RECOLECTADAS EN LOS AÑOS 2019-2020 CON MUESTRAS RECOLECTADAS EN EL PERÍODO 2013-2016…….. 33
5.4.1. ANÁLISIS DE LA VARIANZA MOLECULAR (AMOVA).....33
5.4.2. RELACIÓN GENÉTICA ENTRE LOCALIDADES.....35
5.4.3. ESTRUCTURA POBLACIONAL DE *Plasmodium falciparum* EN ECUADOR 36
5.5. COMPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE LOS BROTES DE 2012-2013 Y DE 2019-2020 EN LA CIUDAD DE ESMERALDAS.....39
5.6. COMPARACIÓN ENTRE *Plasmodium falciparum* ECUATORIANOS Y DE PAÍSES VECINOS.....41
5.6.1. ESTRUCTURA POBLACIONAL DE *Plasmodium falciparum* EN ECUADOR PERÚ Y COLOMBIA.....43
6. DISCUSIÓN 47
6.1. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS PARÁSITOS DE *Plasmodium falciparum* ECUATORIANOS DURANTE LOS AÑOS 2019 Y 2020…. 47
6.2. DIVERSIDAD GENÉTICA DE *P. falciparum* EN LOS AÑOS 2019 Y 2020…. 48
6.3. COMPARACIÓN DE LAS MUESTRAS RECOLECTADAS EN LOS AÑOS 2019-2020 CON MUESTRAS RECOLECTADAS EN EL PERÍODO 2013-2016 EN EL NOROESTE DEL ECUADOR 51

6.4. COMPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE LOS BROTES OCURRIDOS EN LA CIUDAD DE ESMERALDAS EN LOS PERÍODOS 2013-2016 Y 2019-2020…. 52

6.5. COMPARACIÓN ENTRE *Plasmodium falciparum* ECUATORIANOS Y DE PAÍSES VECINOS.....54

7. CONCLUSIONES 57

8. RECOMENDACIONES 59

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 60

10. ANEXOS 67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación de las cuatro localidades de origen de las muestras de este estudio y el número de muestras recolectadas en cada una. 21

Figura 2. Distribución de haplotipos de *Plasmodium falciparum* en las localidades de ciudad de Esmeraldas, San Lorenzo, Tobar Donoso y Colombia en los años 2019 y 2020. 33

Figura 3. Red de haplotipos de muestras de *P. falciparum* en el período 2013-2016 comparadas con muestras colectadas en los años 2019 y 2020 en el noroeste de Ecuador. 36

Figura 4. Distribución de grupos genéticos de *P. falciparum* asignados con el programa Structure versión 2.3.4 en muestras colectadas en las provincias de Esmeraldas y Carchi en Ecuador. 39

Figura 5. Infecciones producidas por *P. falciparum* en la ciudad de Esmeraldas desde 2010. 40

Figura 6. Distribución de los grupos genéticos asignados con el programa Structure versión 2.3.4 en muestras colectadas en Ecuador, Colombia y Perú. ...46

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Muestras utilizadas en el estudio y su procedencia. 18

Tabla 2. Ubicación, motivo de repetición y rango de tamaño de los microsatélites analizados. 23

Tabla 3. Lista de los cebadores utilizados en la tipificación de los microsatélites neutrales de *Plasmodium*. 24

Tabla 4. Número de alelos por localidad de las muestras recolectadas en los años 2019 y 2020 en las provincias de Esmeraldas y Carchi. 30

Tabla 5. Heterocigosidad esperada de cada microsatélite en las diferentes localidades. 31

Tabla 6. Desequilibrio de ligamiento calculado con el índice de asociación (I_A^S) en las diferentes localidades. 31

Tabla 7. Distancia genética entre *P. falciparum* de localidades ecuatorianas (ciudad de Esmeraldas, San Lorenzo y Tobar Donoso) calculada mediante el índice de fijación (F_{st}). 32

Tabla 8. Resultados del análisis de la varianza molecular (AMOVA) realizado a las muestras obtenidas en Ecuador en los períodos 2013-2016 y 2019-2020. 34

Tabla 9. Índices de fijación obtenidos con el programa Arlequin. 35

Tabla 10. Distancia genética entre las localidades ecuatorianas ciudad de Esmeraldas, San Lorenzo y Tobar Donoso comparadas con localidades colombianas y peruanas calculada mediante los índices de fijación (F_{st}). 42

1. RESUMEN

La malaria, también conocida como paludismo, es una enfermedad presente en las zonas tropicales de todo el mundo. Es causada por parásitos de género *Plasmodium* y se transmite por medio de la picadura de mosquitos hembra de los géneros *Anopheles* o *Nyssorhynchus* infectados. La especie *P. falciparum* es la responsable de la mayoría de las muertes ocasionadas por malaria. En el Ecuador la malaria causada por *P. falciparum* ocurre principalmente en la zona noroeste del país, en la frontera con Colombia. Las provincias más afectadas por malaria causada por *P. falciparum* son Esmeraldas y Carchi. Con el fin de contribuir en la vigilancia epidemiológica del país y conocer la situación de los *P. falciparum* circulando en el área mencionada, la presente investigación caracterizó molecularmente parásitos colectados en tres localidades: ciudad de Esmeraldas, San Lorenzo y Tobar Donoso ubicadas en las provincias de Esmeraldas y en Carchi. Las muestras fueron colectadas en los años 2019 y 2020. Se utilizaron siete microsatélites neutrales (TA1, Poly-α, PfPK2, TA109, 2490, C2M34 y C3M69) para analizar un total de 55 muestras de sangre. Las muestras estudiadas fueron comparadas también con muestras procedentes de Perú y Colombia con el fin de determinar la relación entre los parásitos de los tres países. Los resultados demostraron que la diversidad genética en el país es baja y que, en la actualidad, en la zona noroeste del país se encuentran circulando cuatro grupos genéticos. Además, se observó que en las localidades de ciudad de Esmeraldas y Tobar Donoso existen grupos genéticos dominantes, resultado de expansiones clonales. Finalmente, la comparación de las muestras del estudio con las de Perú y Colombia, sugiere que al menos dos de los cuatro grupos presentes en el país provienen de Colombia. Estos resultados pueden contribuir al mejoramiento de programas para la eliminación de *P. falciparum* en el país, ayudan conocer el origen de los *P. falciparum* presentes en el Ecuador en la actualidad, indicando si provienen de países fronterizos o si son parásitos que circulan en el país desde años atrás, y pueden ayudar a desarrollar y mejorar estrategias de control.

Palabras clave: diversidad genética, grupos genéticos, malaria, microsatélites, *Plasmodium falciparum.*

2. ABSTRACT

Malaria is a disease present in tropical areas of the world. It is caused by parasites of the genus *Plasmodium* and is transmitted by the bite of an infected female of *Anopheles* or *Nyssorhynchus* mosquitoes. *P. falciparum* is responsible for most deaths caused by malaria. In Ecuador *P. falciparum* malaria is located mainly in the northwest of the country in the border with Colombia. The provinces most affected by *P. falciparum* are Esmeraldas and Carchi. With the purpose of contributing to the epidemiological surveillance in Ecuador and learn about the situation of the *P. falciparum* parasites circulating in the northwestern area of the country the present study molecularly characterized parasites collected in three locations: Esmeraldas city, San Lorenzo and Tobar Donoso, in Esmeraldas and Carchi provinces. The samples were collected between 2019 and 2020. Seven neutral microsatellites were used (TA1, Poly-α, PfPK2, TA109, 2490, C2M34 y C3M69) for the analysis of 55 blood samples. The studied samples were also compared to samples from Perú and Colombia with the purpose of determining the relationship between the parasites of the three countries. The results confirmed that the genetic diversity in the country is low and that, at present, there are four genetic groups circulating in the northwest of the country. It was also observed that Esmeraldas city and Tobar Donoso localities have one dominant genetic group each. The comparison between the study samples and the ones from Perú and Colombia suggests that two out of the four genetic groups present in northwest Ecuador come from Colombia. These results can contribute to the improvement of programs for *P. falciparum* elimination in the country. These results also help recognize the origins of *P. falciparum* currently present in Ecuador, indicating if they come from border countries or if the parasites have been circulating in the country for several years. These results can help with the development and enhancement of control strategies.

Keywords: genetic diversity, genetic groups, malaria, microsatellites, *Plasmodium falciparum*.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. GENERALIDADES

La malaria, también conocida como paludismo, es una enfermedad infecciosa producida por parásitos del género *Plasmodium* y trasmitida por los mosquitos hembra infectados del género *Anopheles*. Existen cinco especies de *Plasmodium* causantes de malaria en seres humanos: *P. falciparum, P. vivax, P. malariae, P. ovale* y *P. knowlesi*. La malaria se encuentra en zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo y es una de las enfermedades infecciosas que ocasiona más muertes anuales a nivel global, sobre todo en niños y mujeres embarazadas (CDC, 2015a).

Dependiendo de si existen síntomas y de la severidad de los mismos la enfermedad se puede clasificar en severa, no complicada y asintomática. Los síntomas de la malaria son varios y si no son tratados pueden llegar a causar la muerte. Los principales síntomas incluyen nauseas, fiebre, escalofríos, dolor de cabeza y vómitos, estos se presentan de 7 a 15 días después de la picadura de un mosquito infectado (CDC, 2019a). Si no se trata, la enfermedad puede provocar malaria severa, en cuyo caso los síntomas empeoran produciéndose anemia, fallas en órganos como riñones e hígado y estrés respiratorio y malaria cerebral que incluye convulsiones y hemorragias los cuales pueden terminar en la muerte del paciente (OMS, 2018).

3.2. SITUACIÓN DE LA MALARIA EN EL MUNDO

La malaria se encuentra en zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo, principalmente en África subsahariana, Sudeste Asiático y Latinoamérica. En el 2018 se reportaron 228 millones de casos y 405 mil defunciones a nivel mundial. De estas cifras el 93% de los casos y el 94% de las muertes se reportaron en África, siendo los niños menores de 5 años el grupo más afectado ya que el 67% de todas las muertes se produjo en el mismo. *Plasmodium falciparum* es el causante de la mayoría de los casos en África, Sudeste Asiático, Medio Oriente y el Pacífico occidental, mientras que *Plasmodium vivax* es el causante de la mayoría

de las infecciones en América Latina. En el año 2017, 87 países reportaron transmisión de la enfermedad de forma regular (WHO, 2020a).

En América Latina 132 millones de personas se encuentran en zonas endémicas de paludismo y la enfermedad se encuentra distribuida en 18 países que son: Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Guatemala, Guyana, Haití, Honduras, Nicaragua, México, Panamá, República Dominicana, Perú, Belice, El Salvador, Surinam y Venezuela. Desde el año 2005 a 2014 se redujeron de manera sostenida los casos en la región, sin embargo, desde el año 2015 se ha experimentado un nuevo aumento en el número de casos. Cabe mencionar que Guatemala y Honduras reportaron una reducción de casos en los años 2018 y 2019 y que Belice y el Salvador no reportaron casos en 2019, además Paraguay y Argentina mantienen la certificación de países libres de malaria desde 2018 y 2019 respectivamente (OPS/OMS, 2018; WHO, 2020b).

3.3. MALARIA EN ECUADOR

En Ecuador, la malaria se encuentra en zonas de la Costa y la Amazonía. En la zona costera, principalmente al norte en la provincia de Esmeraldas son más comunes las infecciones por *P. falciparum*, mientras que en la Amazonía la mayoría de las infecciones se dan por *P. vivax*. Se calcula que aproximadamente 7 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad en estas zonas del país. No se reportan casos por encima de los 1500 metros de altitud y no se han reportado casos en Guayaquil y Galápagos (MSP, 2019; CDC, 2019a).

Durante el período de tiempo comprendido entre los años 2001 y 2014, el número de casos en el país se redujo en más del 99%, de más de 100 mil a 242. Sin embargo, al igual que otros países de la región, desde el año 2015 se observó un incremento en el número de casos: en el 2015 se reportaron 618 casos, en el 2017 se reportaron 1275, en el 2018 se reportaron 1701 casos en el país, siendo la mayoría producidos por *P. vivax* (91%) las provincias más afectadas fueron Morona Santiago, Pastaza y Orellana. La mayoría de los casos producidos por *P. falciparum* (123 casos) se reportaron en la provincia de Esmeraldas, donde este parásito es más común. En el 2019 se reportaron 2081 casos de malaria a nivel nacional. Al

igual que en 2018, las provincias más afectadas por *P. vivax* fueron Morona Santiago, Pastaza y Orellana con 773, 506 y 365 casos respectivamente y la provincia más afectada por *P. falciparum* fue la provincia de Esmeraldas con 146 casos, seguida de la provincia del Carchi, en donde se reportaron 73 casos de infección por *P. falciparum* en ese año (MSP, 2018; MSP, 2019). Cabe destacar que, a pesar del aumento de casos mencionado, en el país no se han reportado decesos a causa de malaria en los últimos 8 años (Sáenz et al., 2017; WHO, 2020b).

3.4. EL PARÁSITO CAUSANTE DE LA MALARIA, *Plasmodium*

El parásito *Plasmodium* posee 2 fases en su ciclo de vida, en la primera el parásito infecta a vertebrados. Es capaz de infectar a mamíferos, reptiles y aves, hospederos en los que se produce la reproducción sexual del parásito. La segunda fase, la sexual se realiza en el vector (mosquitos del género *Anopheles* o *Nyssorhynchus*). Cinco especies de *Plasmodium* son capaces de infectar a humanos, estas especies son *P. falciparum, P. vivax, P. malariae, P. ovale* y *P. knowlesi* (CDC, 2019; WHO, 2020). *Plasmodium* es un género perteneciente al reino Protista, filo Apicomplexa, clase Aconoidasida, orden Haemosporida, familia Plasmodidae (Gardner et al., 2002).

Las muertes se producen cuando la enfermedad no se trata, causando anemia, malaria cerebral, fallo orgánico entre otras (CDC, 2019b). *P. falciparum* es la especie que causa la mayoría de los casos y las muertes a nivel mundial. Presenta una mayor prevalencia e incidencia en el continente africano (WHO, 2020a).

3.4.1. CICLO DE VIDA DE *Plasmodium*

A lo largo de su ciclo de vida, *Plasmodium* infecta a dos hospederos: el humano que es el hospedero intermedio, en donde ocurre la reproducción asexual del parásito. El segundo, el hospedero definitivo, es el mosquito hembra del género *Anopheles* o *Nyssorhynchus*, en donde ocurre la reproducción sexual (Enomoto et al., 2012).

El ciclo comienza cuando el mosquito infectado pica a un ser humano. Cuando esto ocurre los esporozoitos encontrados en la saliva del mosquito ingresan al torrente sanguíneo y viajan a través del mismo hasta situarse en el hígado, una vez aquí empieza el ciclo exoeritrocítico. Este ciclo dura entre 7 y 30 días. El número de días varía dependiendo de la especie de *Plasmodium* que infecta al hospedero. Los ciclos cortos se observan con mayor frecuencia en infecciones por *P. falciparum* y los más largos en infecciones por *P. malariae*. Los esporozoitos maduran produciendo merozoitos contenidos en esquizontes. Al ser liberados al torrente sanguíneo los merozoitos comienzan a infectar a los glóbulos rojos en lo que se denomina ciclo intraeritrocítico. Durante este ciclo, los merozoitos se reproducen dentro del eritrocito, produciendo trofozoítos inmaduros. En esta etapa, los trofozoítos pueden madurar y pasar a formar esquizontes que al desarrollarse liberarán más merozoitos para repetir el ciclo, o pueden formar gametocitos (micro o macrogametocitos), completando así el ciclo asexual o esquizogónico. El ciclo sexual o esporogónico comienza cuando el vector pica a un humano infectado con *Plasmodium* e ingiere los gametocitos que se encuentran circulando en el torrente sanguíneo. Los gametocitos se diferencian en microgametos (gametos masculinos) y macrogametos (gametos femeninos) y al encontrarse en el estómago del mosquito se fusionan en la fase sexual del ciclo, formando cigotos. Al madurar los cigotos forman un ooquinete, esta estructura atraviesa el intestino del mosquito y pasa a formar un ooquiste que después de un período de 10 a 15 días madura y se rompe, liberando esporozoítos, que migran a las glándulas salivales del mosquito. En este punto el ciclo vuelve a iniciar una vez que el vector pica a un ser humano para alimentarse (Bousema y Drakeley, 2011; Molina, 2015; CDC, 2018a).

3.4.2. GENOMA DE *Plasmodium*

El genoma nuclear de *Plasmodium* tiene 22,8 megabases (MB) distribuidas en 14 cromosomas que contienen 5 300 genes codificadores de proteínas. El 80% de todo el genoma está compuesto por adenina y timina (A+T), siendo la densidad genética de *Plasmodium* de 1 gen por cada 4 338 pares de bases (pb) y el tamaño promedio de cada gen de 2,3 kilobases (kb) si no se toman en cuenta los intrones, que constituyen aproximadamente el 54% de los genes (Gardner et al., 2002).

De todas las proteínas codificadas por el genoma de *P. falciparum,* aproximadamente el 37% están relacionadas con procesos de transcripción, modelamiento de cromatina, reparación de ADN y funciones relacionadas al ARN, 15% está relacionado al ciclo celular y a las interacciones y funciones proteicas, 12% corresponden a subunidades ribosomales y demás factores de traducción, 4% se encuentra en mitocondrias, vacuolas y aparato de Golgi. El 32% de proteínas codificadas restante poseen funciones desconocidas (Oehring et al., 2012).

Además del genoma nuclear, *Plasmodium* también posee un genoma mitocondrial y uno en el apicoplasto (un organelo característico del filo Apicomplexa). El genoma mitocondrial posee un tamaño aproximado de 6 kb y para realizar la síntesis de proteínas necesita importar ARNts del citoplasma, ya que carece de los mismos. El genoma del apicoplasto está formado por 35000 pb, es capaz de generar sus propios ARNts así como de replicar, transcribir y traducir sus propios genes, gracias a estas características codifica proteínas utilizadas en el metabolismo de isoprenoides y ácidos grasos (Gardner et al., 2002).

3.5. VECTOR, MOSQUITO *Anopheles*

El vector transmisor de la malaria es el mosquito hembra del género *Anopheles* o *Nysorhynchus*. Los mosquitos pertenecen al reino Animalia, filo Arthropoda, clase Insecta, orden Diptera, familia Culicidae. El ciclo de vida del mosquito posee cuatro fases que son huevo, larva pupa y adulto. Los tres primeros estadios ocurren en el agua y suelen durar de cinco a 14 días, mientras que el estadio adulto suele durar de dos semanas a un mes. El género contiene más de 400 especies que se encuentran distribuidas a nivel global con excepción de la Antártida, sin embargo, alrededor de 30 son consideradas vectores de importancia de la enfermedad. Una de las especies más eficientes como vector en África es *An. gambiae*. Entre las principales razones para su alta eficiencia se encuentra el hecho de que es altamente antropófago y posee un ciclo de vida largo. En América Latina se encuentran alrededor de 90 especies del mosquito *Anopheles*, de los cuales los principales vectores de la enfermedad son *An. nuneztovari, An. darlingi, An. albimanus, An. pseudopunctipennis* y *An. aquasalis*. En el Ecuador, los principales

vectores del paludismo son *An. albimanus, An.punctimacula, An. eiseni* y *An. pseudopunctipennis* (Hiwat et al., 2010; Arévalo-Herrera et al., 2012; CDC, 2018b).

3.6. SÍNTOMAS DE LA MALARIA

Los síntomas aparecen en un lapso de diez a quince días después de la picadura del mosquito. Estos se presentan con un cuadro febril acompañado de dolores de cabeza, dolor muscular, vómito y escalofríos. Sin tratamiento alguno estos síntomas pueden producir complicaciones mayores y ocasionar la muerte del paciente. Las complicaciones mencionadas pueden presentarse como anemia hemolítica, malaria cerebral, insuficiencia hepática e insuficiencia respiratoria (WHO, 2020a). Dependiendo de la gravedad de los síntomas y la forma en que estos se presenten la malaria puede dividirse en: asintomática, leve, moderada y grave.

Se denomina malaria asintomática cuando a pesar de que un individuo es portador del parásito este no presenta síntoma alguno. Esto se ha observado en zonas endémicas de la malaria y presenta un grave problema ya que, al poseer gametocitos a nivel sanguíneo, los pacientes asintomáticos se convierten en focos de infección que favorecen la propagación de la enfermedad (Sáenz et al., 2017).

Al igual que las infecciones asintomáticas la malaria leve se da en zonas endémicas de la enfermedad, ya que los individuos que se han visto expuestos por lo menos una vez al patógeno desarrollan una respuesta inmune. En este tipo de infección los síntomas descritos con anterioridad se presentan de forma muy leve. La malaria moderada se caracteriza por presentar los síntomas antes descritos: fiebre, cefaleas, etc. La malaria grave o complicada ocurre generalmente cuando la malaria moderada no es tratada, causando un agravamiento de los síntomas. *P. falciparum* es la especie que más casos de malaria complicada produce. Las complicaciones en este tipo de malaria pueden llegar a ser fatales e incluyen fallo renal y hepático, edema pulmonar, malaria cerebral, anemia, deshidratación grave, delirios e hipoglicemia (CDC, 2019b).

Varios de los síntomas desarrollados durante una infección por *Plasmodium* son causados por la liberación de sustancias tóxicas en el torrente sanguíneo al momento de la lisis de los eritrocitos. Entre los principales productos liberados se encuentran la hemozoína y la glucosa fosfato isomerasa (GPI por sus siglas en inglés). Estas sustancias interactúan con los macrófagos, estimulando la producción de citoquinas que son las responsables de producir fiebre, dolor muscular, cefalea, entre otros (CDC, 2019b).

La severidad de la malaria causada por *P. falciparum* es mayor debido a que los eritrocitos infectados con esta especie de *Plasmodium* se adhieren a las paredes endoteliales de los vasos sanguíneos, impidiendo la correcta circulación de sangre. Cuando los vasos obstruidos son los del cerebro se produce la malaria cerebral, que es el factor asociado a la alta mortalidad de este tipo de infecciones (CDC, 2019b).

3.7. DIAGNÓSTICO DE LA MALARIA

Debido a la importancia de la malaria en la salud pública de varios países, es de vital importancia el desarrollo de métodos rápidos y eficaces de diagnóstico e identificación de especie. En la actualidad los métodos más utilizados para diagnóstico son las pruebas rápidas y la microscopía. Además, se usan métodos moleculares en el área de investigación (WHO; 2020a).

El diagnóstico por microscopia es el “gold standard” del diagnóstico de la malaria y es el método más utilizado a nivel mundial para su determinación. Puede realizarse de dos maneras, el frotis sanguíneo y la gota gruesa. En ambos casos la placa debe ser teñida con colorante Giemsa. El frotis sanguíneo permite observar las características morfológicas de los parásitos encontrados en la muestra. La gota gruesa permite diagnosticar infecciones con cargas parasíticas bajas. La ventaja de este tipo de análisis es que permite detectar parasitemias de hasta 50 parásitos por microlitro; la desventaja es que para esto se necesitan de microscopistas expertos (Campos et al., 2011; Canier et al., 2013).

Las pruebas rápidas o RDTs (por sus siglas en inglés) son dispositivos inmunocromatográficos de flujo lateral. Su funcionamiento se basa en la detección de antígenos específicos de *Plasmodium* en muestras de sangre. Los principales antígenos blanco de este tipo de pruebas son la aldolasa, la lactato deshidrogenasa (LDH) y la proteína rica en histidina 2 (HRP2), las dos primeras proteínas se utilizan para la detección de varias especies de *Plasmodium*, mientras que la HRP2 se utiliza únicamente para el diagnóstico de *P. falciparum* (Akinyi et al., 2013). Las ventajas de este tipo de pruebas consisten en que no requieren de equipos ni electricidad, no requieren de personal altamente capacitado y los resultados se obtienen en menos de 20 minutos, lo que las hace ideales para ser utilizadas en zonas de difícil acceso (Amoah et al., 2016). La desventaja de este tipo de pruebas consiste en su sensibilidad, ya que no es capaz de detectar parasitemias menores a 100 parásitos por microlitro, debajo de este valor los resultados son poco confiables. Además, este tipo de pruebas posee una baja sensibilidad y hay un alto número de falsos negativos, sobre todo en infecciones por *P. falciparum* debido a deleciones en *hrp2*, gen que codifica para una de las proteínas que es utilizada para el diagnóstico en este tipo de pruebas (Torrús et al., 2015; WHO, 2020).

La técnica molecular más utilizada para el estudio de la malaria es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). Este método utiliza el ADN previamente extraído de la muestra sanguínea. Para mejorar la sensibilidad y especificidad de la prueba se pueden realizar variaciones como la PCR anidada o en tiempo real. La ventaja de las técnicas moleculares es su capacidad de detección, que alcanza para determinar si existen parásitos en muestras con densidades parasíticas de un parásito por microlitro de sangre. La desventaja de este tipo de métodos consiste en su alto costo y necesidad de personal capacitado y equipo especializado. Por estas razones no es utilizado como método diagnóstico y su uso se restringe únicamente a la investigación (Zoghi et al., 2012; Mahende et al., 2016).

3.8. TRATAMIENTO

En la actualidad la OMS recomienda tratar la malaria producida por *P. falciparum* con una combinación de derivados de la artemisinina. Se utiliza más de

un medicamento para la prevención de la resistencia a fármacos, y porque los derivados de artemisinina poseen una vida media sumamente corta, por lo que es necesario combinarlos con otros medicamentos de vida media superior para que el tratamiento sea más eficaz (Dondorp et al., 2009; Fairhurst et al., 2012). En el Ecuador, el tratamiento para combatir la malaria por *P. falciparum* es artemeter-lumefantrina (AL) por tres días, seguido de primaquina (PQ) en el cuarto día (malaria es leve o moderada). El tratamiento para malaria grave es quinina (QN). Es recomendable que el tratamiento comience lo más pronto posible una vez confirmado el diagnóstico, para así evitar complicaciones (WHO, 2020a). El tratamiento para malaria producida por *P. vivax* en el Ecuador consiste en cloroquina por tres días en combinación con primaquina por 14 días (WHO, 2015; MSP, 2019b).

3.9. RESISTENCIA A FÁRMACOS

La resistencia a antimaláricos se reportó por primera vez en los años sesenta en una infección por *P. falciparum* que no pudo ser tratada con cloroquina (WHO, 2020a). La resistencia es producida por mutaciones puntuales en el ADN del parásito. Dichas mutaciones producen cambios en la expresión genética, alterando los aminoácidos que conforman las proteínas. Esto resulta en cambios en las proteínas blanco de los fármacos, haciendo que estos pierdan su efectividad (Domínguez et al., 2010). Entre las principales causas para el desarrollo y aumento de la resistencia se encuentran el mal diagnóstico, mala calidad de los fármacos utilizados, dosis equivocadas o tratamiento incompleto e interacciones con otras drogas o sustancias (WHO, 2020b).

En la actualidad se han reportado casos de cepas resistentes de *P. falciparum* en varios países. En el Sudeste Asiático países como India, Myanmar, Camboya, Laos y Bangladesh presentan índices de resistencia a artemisinina superiores al 10%, y en casos como Tailandia, la resistencia a artemisinina supera el 90%. Esto ha causado cambios en los tratamientos en la zona, en donde la mayoría de los países tenían como tratamiento de primera línea artersunato-amodiaquina e dihidroartemisinina-piperaquina, que por falta de eficacia han sido

reemplazados con un tratamiento a base de artesunato-pyronaridina (WHO, 2020b).

En África se han reportado casos de resistencia a drogas de primera línea como artemeter-lumefantrina, artersunato-amodiaquina y dihidroartemisinina-piperaquina en países como Gambia, Malawi, Guinea Ecuatorial y Angola. Sin embargo, son casos aislados y se considera que dichos casos se deben a errores en la metodología aplicada y, por ende, no son representativos estadísticamente, por lo que aún no se ha confirmado la presencia de parásitos resistentes en África (WHO, 2020b).

En Latinoamérica se ha reportado en Guyana, mutaciones relacionadas a la resistencia a artemisinina en el gen PfKelch13 en 5.1% de las muestras analizadas, mutaciones que de acuerdo a los estudios son independientes de las producidas en el continente asiático, sin embargo, la presencia de este gen no confiere resistencia al tratamiento utilizado. Se ha reportado también un caso de *P. falciparum* resistente al tratamiento con artemeter-lumefantrina, esto ocurrió durante un estudio llevado a cabo en Surinam, en el que uno de los 11 sujetos del estudio presentó resistencia al tratamiento con artemeter-lumefantrina (Chenet et al., 2016; WHO, 2020b).

En el Ecuador, en la provincia de Esmeraldas, se ha determinado la presencia de *P. falciparum* resistentes a cloroquina y ligeramente resistentes a quinina. No se han reportado casos de resistencia al tratamiento actual (Valenzuela, 2013; Sáenz et al., 2015).

3.10. VACUNA CONTRA LA MALARIA

El desarrollo de una vacuna ha sido un problema recurrente en la lucha contra la malaria. Esto ocurre por diversos factores, para empezar su complejidad es superior a virus y bacterias, que son los organismos para los que se desarrollan vacunas normalmente, además, el complejo ciclo de vida de *Plasmodium,* la variación antigénica por parte del parásito y el hecho de que posee un estadio sexual y uno asexual dificultan la elección de un antígeno determinado. Por esto,

las vacunas desarrolladas no han logrado otorgar una inmunidad duradera y no se ha conseguido seleccionar un blanco adecuado para una vacuna (Thera y Plowe, 2012).

Sin embargo, a pesar de dichas dificultades se han logrado avances en los años recientes. En la actualidad existen cinco tipos diferentes de vacunas en desarrollo, todas enfocadas en distintos estadios de *Plasmodium*, estas son: vacunas preeritrocíticas, vacunas contra estadios hemáticos, vacunas de bloqueo de transmisión, vacunas multiestadios o multiantígenos y vacunas vivas atenuadas (Thera y Plowe, 2012). Actualmente, la vacuna avanzada en términos clínicos es la RTS, S/AS01. Esta vacuna fue aprobada por la Agencia Europea de Medicina en el año 2015, como antígeno utiliza la proteína CSP de *P. falciparum*, la vacuna actúa produciendo anticuerpos que causan el desprendimiento de la proteína, bloqueando así la invasión de hepatocitos por parte del parásito (Gosling y Seidlein, 2016; ISGlobal, 2018). En el año 2016, la OMS reconoció oficialmente los beneficios para la salud pública de la vacuna y en el año 2018 las autoridades de tres países africanos (Ghana, Kenia y Malawi) autorizaron su uso en un programa piloto, programa que hasta abril del 2019 logró vacunar a aproximadamente 275 000 niños. En la actualidad se esperan los resultados de las vacunaciones realizadas para que la OMS pueda recomendar su uso a gran escala en el resto de los países endémicos de la enfermedad. No se puede reemplazar con esta vacuna al tratamiento sugerido por la OMS, ya que la eficacia de la vacuna no supera el 29% por lo que aún se considera que la inmunidad que esta produce es demasiado baja y poco duradera (WHO, 2020c).

3.11. ESTRUCTURA POBLACIONAL DE *Plasmodium falciparum*

La genética de poblaciones es el estudio de los cambios y variaciones en los genomas de diferentes poblaciones, dichos cambios son producidos por mutaciones puntuales en el ADN. La variación genética está directamente relacionada con la recombinación que ocurre durante la reproducción sexual (Curtis et al., 2008). Para estimar la diversidad genética de una población se realizan estudios estadísticos como el de heterocigosidad esperada y el desequilibrio de ligamiento (Reece y Hobbins, 2010).

Para estudiar genotipos en investigaciones de genética poblacional se utilizan marcadores moleculares. En el caso de los estudios realizados con *Plasmodium*, se pueden utilizar microsatélites, polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLPs), secuencias repetitivas intersimples (ISSRs), polimorfismos de ADN amplificados al azar (RAPDs), polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs) o los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) (Avise, 2012).

Los microsatélites son repeticiones cortas en tándem, están compuestos de 2 a 8 nucleótidos. En *P. falciparum* se han aislado y secuenciado alrededor de 900 microsatélites, que se encuentran distribuidos en el genoma cada 2 a 3 kb, tanto en zonas codificantes como no codificantes (Anderson et al., 2000; Ellegren, 2004; Guichoux et al., 2011). La variación encontrada en este tipo de marcadores se debe al deslizamiento de la cadena de ADN durante el proceso de replicación, por locus, la tasa aproximada de mutación es de 10^{-3} a 10^{-4}. Los microsatélites son ampliamente utilizados en estudios de este tipo, ya que permiten: I) conocer el origen geográfico de un brote, II) comparar los genomas de distintas poblaciones, III) detectar infecciones múltiples, IV) distinguir entre infecciones nuevas y anteriores y V) determinar rasgos hereditarios productos de cruces genéticos (Orjuela-Sánchez et al., 2013).

Estudios poblacionales a nivel global midieron la diversidad genética de *P. falciparum.* Estos estudios demostraron que la heterocigosidad en África subsahariana es alta, en el Sudeste Asiático intermedia y en Latinoamérica baja (Anderson et al., 2000).

Estudios poblacionales realizados en América Latina sugieren que los parásitos de *P. falciparum* fueron introducidos por medio del tráfico de esclavos ocurrido durante la colonización del continente por parte de España y Portugal. Esto se explica al observar la distribución poblacional, en la que se observan tres grupos genéticos principales, el primero corresponde a Colombia, el segundo a Brasil y Bolivia y el tercero a Guyana Francesa, estos grupos se encuentran separados por Perú y Venezuela, países en donde las poblaciones parecen actuar como

intermediarios al observarse una mezcla de ambas poblaciones en estos países, así como una mayor diversidad genética (Yalcindag et al., 2012). En un estudio publicado por Griffing et al. (2011) en el que utilizó muestras provenientes de infecciones producidas en Perú entre 1999- 2000 y 2006-2007, se encontró que en Perú existían cinco clones bien definidos que se denominaron A, B, C, D y E. En el estudio, se observó claramente que en la costa del Pacífico de Perú se encontraban únicamente parásitos del linaje clonal E y en la Amazonía este se observaron parásitos de los linajes clonales A, B, C y D. Estudios posteriores en Colombia demostraron que al igual que en Perú, las poblaciones encontradas en Colombia son, en su gran mayoría clonales (Echeverry et al., 2013), en un estudio realizado por Murillo et al. (2015) se encontraron cuatro grupos genéticos circulando en Colombia entre 2008 y 2009 y en un estudio publicado por Dorado et al. (2016) realizado con muestras colectadas entre 2011 y 2012, se encontraron parásitos con perfiles de microsatélites muy similares a los linajes clonales B y E descritos en Perú por Griffing et al. (2011), en las muestras colectadas entre 1999 y 2000, parásitos que se denominaron B variante 1 (B_{V1}) y E variante 1 (E_{V1}), adicionalmente se encontraron parásitos con un perfil de microsatélites diferente, este linaje clonal se denominó F.

En el Ecuador Vera-Arias, Castro, Gómez y Sáenz (2019), realizaron un estudio sobre la caracterización genética de muestras de *P. falciparum* colectadas entre 2013 y 2016. Este estudio indica que, los parásitos encontrados en Esmeraldas provienen de países limítrofes del Ecuador, principalmente Colombia y, en menor medida Perú. Esto indica también, que los parásitos circulan en tasas muy bajas, esto significa que casi no se dan infecciones múltiples en la zona, por ende, los genomas de los parásitos no se ven alterados de manera significativa durante la fase sexual en el mosquito, esto explica porque en el país las poblaciones genéticas son de naturaleza clonal. El estudio de Vera-Arias et al., (2019) indica que en Ecuador existen tres grupos genéticos de *P. falciparum*. Estudios demostraron que la mayoría de los parásitos encontrados en San Lorenzo (Esmeraldas-Ecuador) guardaban una estrecha relación con los parásitos de Nariño (Colombia) y que un ligero porcentaje de parásitos estaba relacionado con el grupo clonal E (originalmente descrito en Perú), por otro lado, casi todos los parásitos encontrados en la ciudad de Esmeraldas poseían una estrecha relación

genética con los de la costa de Perú de finales del siglo XX (linaje clonal E) (Sáenz et al., 2015; Vera-Arias et al., 2019). Estos parásitos fueron identificados en un brote ocurrido entre 2012 y 2013 en la ciudad de Esmeraldas en los que se observó que todos los parásitos a excepción de uno poseían un perfil de microsatélites idéntico, es decir fue un brote clonal. Adicionalmente, se comprobó que estos parásitos compartían el mismo perfil de microsatélites que los parásitos descritos en la costa de Perú a finales del siglo XX, parásitos muy similares genéticamente a Ecu1110, un parásito de Esmeraldas de 1990 (Sáenz et al., 2015). Por último, existía un tercer grupo genético que se encontraba en pequeñas proporciones tanto en San Lorenzo, como en la ciudad de Esmeraldas (linaje clonal D) y este grupo genético era uno de los principales en el oeste de la Amazonía peruana (Griffing et al., 2011; Baldeviano et al., 2015; Sáenz et al., 2015; Vera-Arias et al., 2019).

En Ecuador, los estudios sobre los *P. falciparum* circulantes y su origen se limitan al estudio realizado por Sáenz et al. (2015) y el estudio realizado por Vera-Arias et al. (2019) por lo que no existe mucha información sobre las cepas circulando en Ecuador en la actualidad, así también se desconoce su origen, diversidad genética y la relación existente con cepas de los países limítrofes Perú y Colombia.

Los estudios moleculares son de suma importancia en la vigilancia epidemiológica, ya que permiten conocer la procedencia de los parásitos de la malaria, lo que puede ayudar a su tratamiento, prevención y eliminación. Por lo que el presente estudio utiliza microsatélites como marcadores moleculares para caracterizar a los *P. falciparum* que se encuentran circulando en la actualidad en el norte del Ecuador. Esto con el fin de conocer: I) si los parásitos provienen de países vecinos, II) si son parásitos de origen autóctono circulando en baja medida en el país y III) conocer también la diversidad genética actual de las poblaciones de *P. falciparum* presentes en las provincias de Esmeraldas y Carchi.

3.12. OBJETIVOS

3.12.1. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar a los *Plasmodium falciparum* de las provincias de Esmeraldas y Carchi circulando en el 2019 y 2020.

3.12.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar los grupos genéticos circulantes de *P. falciparum* obtenidos en los últimos años con cepas previamente analizadas de años y brotes anteriores.

- Determinar el origen de *P. falciparum* circulando actualmente en las provincias de Esmeraldas y Carchi.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. ÉTICA

El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación en seres humanos de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (CEISH PUCE) mediante el oficio: CEISH-571-2018 el 03/07/2018 y por la Dirección de Inteligencia del Ministerio de Salud Pública (MSP) mediante el oficio: MSP-DIS-2019-004-O del 4 de febrero del año 2019.

4.2. POBLACIÓN

Las muestras utilizadas en el estudio fueron colectadas en la provincia de Esmeraldas, en los cantones San Lorenzo y Esmeraldas y en el cantón Tulcán de la provincia del Carchi. Ambas provincias se encuentran al norte del territorio ecuatoriano, en la frontera con Colombia. Las muestras fueron colectas en los años 2019 y 2020 en las localidades de ciudad de Esmeraldas y San Lorenzo en la provincia de Esmeraldas y Tobar Donoso en la provincia del Carchi (Tabla 1). La ubicación de las localidades en el mapa se puede observar en la Figura 1.

Tabla 1. Muestras utilizadas en el estudio y su procedencia.

Muestra	Provincia	Cantón	Parroquia	Fecha
Pf077	Carchi	Tulcán	Tobar Donoso	08/03/2019
Pf078	Carchi	Tulcán	Tobar Donoso	08/03/2019
Pf079	Carchi	Tulcán	Tobar Donoso	08/03/2019
Pf080	Carchi	Tulcán	Tobar Donoso	08/03/2019
Pf081	Esmeraldas	San Lorenzo	Mataje	14/03/2019
Pf082	Carchi	Tulcán	Tobar Donoso	01/04/2019
Pf083	Carchi	Tulcán	Tobar Donoso	04/04/2019
Pf084	Carchi	Tulcán	Tobar Donoso	05/04/2019
Pf085	Carchi	Tulcán	Tobar Donoso	05/04/2019
Pf086	Carchi	Tulcán	Tobar Donoso	15/04/2019
Pf087	Carchi	Tulcán	Tobar Donoso	18/04/2019

Continuación de la Tabla1.

Muestra	Provincia	Cantón	Parroquia	Fecha
Pf088	Carchi	Tulcán	Tobar Donoso	19/04/2019
Pf089	Esmeraldas	San Lorenzo	Ancón	30/04/2019
Pf090	Carchi	Tulcán	Tobar Donoso	06/05/2019
Pf091	Colombia	Nariño		24/06/2019
Pf092	Esmeraldas	San Lorenzo	San Lorenzo	16/07/2019
Pf093	Carchi	Tulcán	Tobar Donoso	17/07/2019
Pf094	Carchi	Tulcán	Tobar Donoso	28/07/2019
Pf095	Colombia	Nariño		20/08/2019
Pf096	Carchi	Tulcán	Tobar Donoso	27/08/2019
Pf097	Carchi	Tulcán	Tobar Donoso	02/09/2019
Pf098	Carchi	Tulcán	Tobar Donoso	05/09/2019
Pf099	Esmeraldas	San Lorenzo	Ancón	06/10/2019
Pf100	Colombia	Nariño		06/10/2019
Pf101	Pastaza	Mera		06/10/2019
Pf102	Colombia	Nariño		02/12/2019
Pf103	Esmeraldas	Esmeraldas		17/12/2019
Pf104	Esmeraldas	Esmeraldas	Tachina	15/01/2020
Pf105	Esmeraldas	Esmeraldas	Tachina	15/01/2020
Pf106	Esmeraldas	Esmeraldas	Tachina	15/01/2020
Pf107	Esmeraldas	Esmeraldas	Tachina	15/01/2020
Pf108	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	16/01/2020
Pf109	Esmeraldas	Esmeraldas	Tachina	03/02/2020
Pf110	Esmeraldas	Esmeraldas	Bartolomé Ruiz	05/02/2020
Pf111	Esmeraldas	Esmeraldas	Bartolomé Ruiz	05/02/2020
Pf112	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	06/02/2020
Pf113	Carchi	Tulcán	Tobar Donoso	27/02/2020
Pf114	Colombia	Nariño		03/03/2020
Pf115	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	15/02/2020
Pf116	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	22/02/2020
Pf117	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	28/02/2020

Continuación de la Tabla 1.

Muestra	Provincia	Cantón	Parroquia	Fecha
Pf118	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	03/03/2020
Pf119	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	04/03/2020
Pf120	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	05/03/2020
Pf121	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	09/03/2020
Pf122	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	10/03/2020
Pf123	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	11/03/2020
Pf124	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	14/03/2020
Pf125	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	14/03/2020
Pf126	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	18/03/2020
Pf127	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	19/03/2020
Pf128	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	19/03/2020
Pf129	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	26/03/2020
Pf130	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	29/03/2020
Pf131	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	18/04/2020

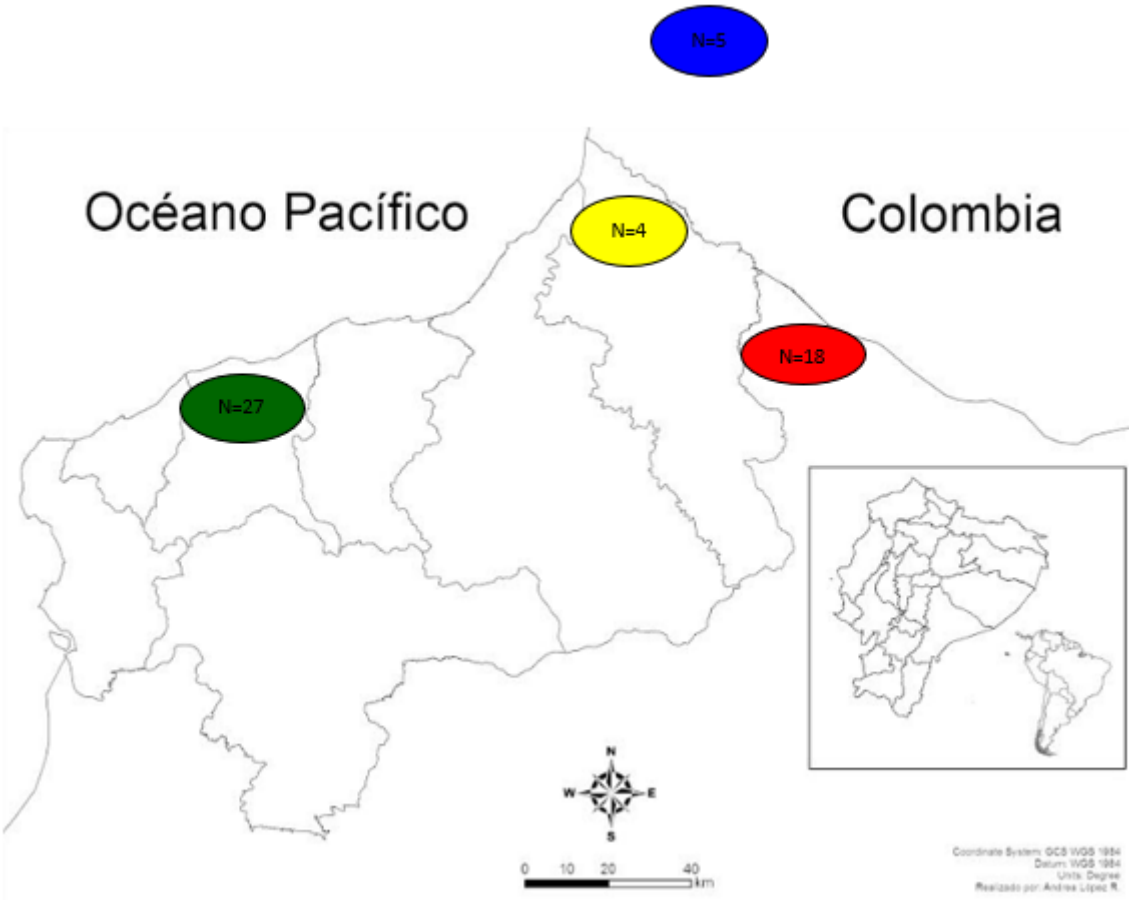


Figura 1. Ubicación de las cuatro localidades de origen de las muestras de este estudio y el número de muestras colectadas en cada una. Las muestras provenientes de Nariño Colombia fueron colectadas en la localidad de San Lorenzo. Cada color representa una localidad diferente: ciudad de Esmeraldas en verde, San Lorenzo en amarillo, Tobar Donoso en rojo y Nariño en azul.

4.3. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Las muestras fueron colectadas por personal del MSP y fueron tomadas a personas infectadas por *Plasmodium falciparum*. Las condiciones de inclusión en el estudio fueron residir en el área de estudio, tener más de dos años de edad, estar de acuerdo en participar en el estudio y firmar el consentimiento informado (Anexo 1) y en el caso de menores de edad también el asentimiento informado (Anexo 2). El diagnóstico fue confirmado mediante pruebas rápidas o microscopía, en algunos casos por ambas pruebas. Las muestras de sangre fueron tomadas mediante punción dactilar utilizando una lanceta. La sangre colectada se conservó en forma

de gotas en papel filtro Whatman (1MM o 3MM) a una temperatura de 4ºC. En total se colectaron 55 muestras que se codificaron como Pf (por *P. falciparum*) empezando por el número 077 y terminando en el número 131. Como control se utilizó la cepa NF54.

4.4. EXTRACCIÓN DE ADN

El ADN genómico de *P. falciparum* se extrajo del papel filtro utilizando el PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Life Technology, EE. UU.). El protocolo de extracción se detalla a continuación:

En un tubo de microcentrífuga de 1.5mL se colocó un círculo de papel filtro impregnado de sangre infectada cortado en pedazos, se les añadió 180µL de buffer de digestión y 20µL de proteinasa K. Después se mezcló cada muestra en un vórtex y se puso los tubos a incubar a 55°C por 30 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó los tubos a 4000rpm durante 1 minuto y se transfirió el líquido a un nuevo tubo de 1.5mL.

Posteriormente se añadieron 20µL de RNasa y se dejó incubar los tubos a temperatura ambiente durante 2 minutos. Después se añadieron 200µL de buffer de lisis-unión y 200µL de etanol absoluto, se mezcló la solución en vórtex y se transfirió a una columna de extracción en donde se centrifugó a 12000rpm durante un minuto.

Una vez terminada la centrifugación se descartó el líquido filtrado, se colocó la columna en un tubo nuevo de 1.5mL y se añadieron 500µL de buffer de lavado 1 y se centrifugó la columna a 12000rpm durante un minuto. Terminada la centrifugación se volvió a descartar el líquido filtrado y a colocar la columna en un tubo nuevo de 1.5mL, en donde se añadieron 500µL de buffer de lavado 2, después de lo cual se centrifugó a 13000rpm durante 3 minutos.

Una vez terminado el lavado se descartó el líquido filtrado y se colocó la columna en un nuevo tubo de 1.5mL. Para recolectar el ADN se añadieron 40µL de buffer de elusión en la columna, se incubó a temperatura ambiente durante 2

minutos y se centrifugó a 14000rpm durante un minuto. Para finalizar se repitió el proceso anterior con 20µL de buffer de elusión y se centrifugó a 14000rpm durante 3 minutos después de lo cual se descartó la columna de extracción y se almacenó el ADN extraído a -20°C para su posterior procesamiento.

4.5. AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES

El ADN extraído se utilizó para amplificar siete microsatélites (TA1, Poly-α, PfPK2, TA109, 2490, C2M34 y C3M69) del genoma de *P. falciparum* (Tabla 2).

Tabla 2. Ubicación, motivo de repetición y rango de tamaño de los microsatélites analizados.

Microsatélite	Cromosoma	Motivo	Rango
TA1	6	ATT	171
Poly-α	4	ATT	149-180
PfPK2	12	TAA	159-177
TA109	6	AAT	159
2490	10	TAA	72-84
C2M34	2	AT, TATT	224-232
C3M69	3	TA	122-140

De estos microsatélites cinco fueron amplificados por PCR semianidada y dos fueron amplificados utilizando una PCR convencional. Los cebadores utilizados para las reacciones se encuentran descritos en la tabla 3.

Tabla 3. Lista de los cebadores utilizados en la tipificación de los microsatélites neutrales de *Plasmodium falciparum*.

Primer	Secuencia (5`-3`)
Neu1_TA1_F	CTA CAT GCC TAA TGA GCA
Neu1_TA1_R	TTT TAT CTT CAT CCC CAC
Neu1_TA1_F_HEX	CC GCT ATA AGT GCA GAG C
Neu3_Poly-α_F	AAA ATA TAG ACG AAC AGA
Neu3_Poly-α_R	ATC AGA TAA TTG TTG CTA
Neu3_Poly-α_R_FAM	GA AAT TAT AAC TCT ACC A
Neu7_PfPK2_F	CTT TCA TCG ATA CTA CGA
Neu7_PfPK2_R	CCT CAG ACT GAA ATC CAT
Neu7_PfPK2_R_HEX	AAA GAA GGA ACA AGC AGA
Neu9_TA109_F	TAG GGA ACA TCA TAA GGA T
Neu9_TA109_R	CCT ATA CCA AAC ATG CTA AA
Neu9_TA109_F_FAM	GG TTA AAT CAG GAC AAC AT
Neu12_2490_F	TTC TAA ATA GAT CCA AAG
Neu12_2490_R	ATG ATG TGC AGA TGA CGA
Neu12_2490__FAM	AGA ATT ATT GAA TGC AC
313_F_FAM	TC CCT TTT AAA ATA GAA GAA A
313_R	GAT TAT ATG AAA GGA TAC ATG
383_F_HEX	AA TAG GAA CAA ATC ATA TTG
383_R	AGA TAT CCA GGT AAT AAA AAG

Las condiciones de las reacciones realizadas se describen a continuación:

4.5.1. AMPLIFICACIÓN DE LOS MICROSATÉLITES TA1, Poly-α, PfPK2, TA109 Y 2490

Los microsatélites TA1, Poly-α, PfPK2, TA109 y 2490 fueron amplificados mediante una PCR semianidada por lo que se realizaron dos reacciones.

Para la primera reacción se realizó una solución con volumen final de 15.2µL compuesta por 7.5µL de GoTaq Colorless Mastermix (Promega, Madison, WI,

USA), 0.6µL de cada primer (10µM), 2.5µL de agua ultrapura y 4µL de ADN. El perfil térmico de la primera PCR fue el siguiente: denaturación inicial a 94°C por 2 minutos, seguido de 25 ciclos a 94°C por 30 segundos, 42°C por 30 segundos, 40°C por 30 segundos, 65°C por 40 segundo, terminando con una extensión final a 65°C por dos minutos.

Para la segunda PCR se realizó una solución con volumen final de 30µL compuesta por 15µL de GoTaq Colorless Mastermix (Promega, Madison, WI, USA), 1.2µL de cada primer (10µM), 6.6µL de agua ultrapura y 6µL de ADN obtenido en la primera PCR. El perfil térmico de la primera PCR fue el siguiente: denaturación inicial a 94°C por 2 minutos, seguido de 25 ciclos a 94°C por 20 segundos, 45°C por 20 segundos, 65°C por 30 segundos, terminando con una extensión final a 65°C por dos minutos.

4.5.2. AMPLIFICACIÓN DE LOS MICROSATÉLITES C2M34 Y C3M69

Los microsatélites C2M34 y C3M69 fueron amplificados mediante una PCR convencional. El volumen final de la solución fue de 30µL compuesta por 15µL de GoTaq Colorless Mastermix (Promega, Madison, WI, USA), 1.2µL de cada primer (10µM), 6.6µL de agua ultrapura y 6µL de ADN obtenido en la primera PCR. El perfil térmico de la primera PCR fue el siguiente: denaturación inicial a 94°C por 2 minutos, seguido de 5 ciclos a 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 94°C por 30 segundos, terminando con 40 ciclos a 45°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos.

Los cebadores utilizados en la segunda PCR de los microsatélites TA1, Poly-α, PfPK2, TA109 y 2490 y las PCR de los microsatélites C2M34 y C3M69 fueron previamente etiquetados con marcadores fluorescentes (HEX y FAM) para su posterior análisis mediante electroforesis capilar.

4.6. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE REPETICIONES DE LOS MICROSATÉLITES

El tamaño de los microsatélites se determinó por electroforesis capilar, este procedimiento fue realizado por la empresa Macrogen en la República de Corea del Sur. Para esto se enviaron 20µL de los amplicones obtenidos en las PCRs realizadas, procedimiento que fue aprobado por el Ministerio de Salud Pública del Ecuador.

4.7. ANÁLISIS DEL TAMAÑO DE FRAGMENTOS

Los datos recibidos de la empresa Macrogen fueron procesados y analizados con el software Peak Scanner v. 1.0. (Applied Biosystems, 2006). Esta herramienta bioinformática transforma las imágenes obtenidas en el proceso de electroforesis capilar en picos coloreados de diferente longitud. Para el análisis a todas las muestras se les asignó un marcador de tamaño estándar de “GS400HD” y para el método de análisis se escogió la opción “Sizing Default-PP”. Los datos obtenidos se organizaron por muestra y éstas a su vez se organizaron por localidad.

4.8. ANÁLISIS DE ESTRUCTURA POBLACIONAL

4.8.1. SOFTWARE ARLEQUIN

El software Arlequin 3.5.2.2. (Swiss Institute of Bioinformatics, 2015). es un programa que realiza diversos análisis de genética poblacional. Se utilizó este software para calcular la frecuencia alélica, heterocigosidad esperada (He), el análisis de variancia molecular (AMOVA) y los índices de fijación (FSTs). A las muestras obtenidas en los años 2019 y 2020 se las comparó con las obtenidas en el periodo 2013-2016.

4.8.2. SOFTWARE NETWORK

El software Network v. 10.0 (Fluxus Technology Ltd., 2012) se utilizó para crear diagramas de redes que indican la relación genética entre las muestras analizadas. Se creó una red únicamente con las muestras obtenidas en los años

2019-2020 y una red con las muestras del Ecuador de los periodos 2013-2016 y 2019-2020.

4.8.3. SOFTWARE STRUCTURE

El software Structure v. 2.3.4 (Pritchard et al., 2010) utiliza métodos de análisis bayesianos con el fin de inferir el número más probable de grupos genéticos. Se realizó un primer análisis con muestras únicamente de territorio ecuatoriano obtenidas en los períodos 2013-2016 y 2019-2020. El segundo análisis se lo realizó utilizando también muestras históricas de Perú y Colombia. Se realizaron entre 10000 y 100000 repeticiones, el número de poblaciones esperado (K) se fijó en 10 y el número de simulaciones para cada población se fijó en 15.

4.8.4. SOFTWARE LIAN

El software LIAN v. 3.7 (Haubold y Hudson, 2000) se utilizó para el cálculo del desequilibrio de ligamiento, determinado en este caso por el índice de asociación (I^S_A). Este análisis se realizó por separado en cada una de las localidades estudiadas (Esmeraldas, San Lorenzo y Tobar Donoso).

4.9. GENERACIÓN DE MAPAS

Se elaboraron mapas utilizando gráficos de pastel de Microsoft Word para observar con mayor facilidad los resultados obtenidos con el software Structure v. 2.3.4 (Pritchard et al., 2010) y así comparar entre dos períodos diferentes de tiempo (2013-2016 y 2019-2020) como han variado las poblaciones de parásitos en los últimos años.

5. RESULTADOS

5.1. MUESTRAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO

En este estudio se utilizaron 55 muestras confirmadas como *P. falciparum*, las cuales fueron tomadas entre marzo del 2019 y abril del 2020, codificadas como Pf por *P. falciparum* y numeradas desde Pf077 hasta Pf131. En la tabla 1 se describe la procedencia exacta, el código asignado y la fecha de colección de cada muestra. En la figura 1 se observa un mapa con la ubicación de las muestras obtenidas. Las muestras se obtuvieron en las provincias de Esmeraldas y Carchi y se agruparon en tres localidades distintas para facilitar el análisis, estas localidades fueron ciudad de Esmeraldas (24 muestras), San Lorenzo (4 muestras) y Tobar Donoso (18 muestras), las dos primeras pertenecen a la provincia de Esmeraldas y la tercera al Carchi. Adicionalmente, se obtuvieron cinco muestras de casos de Colombia que fueron diagnosticadas en Ecuador y una de la provincia de Pastaza.

Las muestras colectadas de los casos procedentes de Colombia fueron utilizadas para los análisis realizados en los programas Structure (versión 2.3.4.) y Network (versión 10.0.) para poder comparar la relación genética de los parásitos ecuatorianos con los colombianos. La muestra Pf101 procedente de Pastaza fue excluida de todos los análisis, ya que una única muestra de otra localidad no fue representativa para el estudio, además, la mayoría de los análisis realizados requirieron de un mínimo de cuatro o cinco muestras para que puedan correr los programas.

5.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS MICROSATÉLITES

Para determinar el número de repeticiones de los microsatélites en las muestras de estudio, se realizó una PCR semianidada a los microsatélites TA1, Poly-α, PfPK2, TA109 y 2490 y una PCR convencional para los microsatélites C2M34 y C3M69. El tamaño de los productos amplificados fue determinado en Corea del Sur por la empresa Macrogen.

Una vez procesados los resultados de la electroforesis capilar con el software Peak Scanner se pudo observar que todos los amplicones del microsatélite TA1 tuvieron un tamaño de 171 pares de bases (pb), los de Poly-α poseían tamaños de 147, 150 y 180 pb, para PfPK2 168, 171, 174 y 189, en TA109 se obtuvo un solo tamaño de fragmento de 160 pb, para 2490 se obtuvieron tres valores, 69, 72 y 78, para C2M34 224, 232 y 234 pb y para C3M69 124 y 140.

Las muestras Pf085, Pf105, Pf108 y Pf120 fueron excluidas para posteriores análisis, ya que tres o más microsatélites no mostraron resultados en la electroforesis capilar. En total se realizaron 696 reacciones de amplificación durante el estudio, 55 aislados de las muestras obtenidas, el control positivo NF54, un control interno (Pf003), muestra proveniente de la ciudad de Esmeraldas durante el brote del 2013 (Sáenz et al., 2015), y un control negativo (agua purificada).

5.3. ESTRUCTURA POBLACIONAL DE *P. falciparum* EN ECUADOR EN LOS AÑOS 2019 Y 2020

5.3.1. POLIMORFISMO Y HETEROCIGOSIDAD

Utilizando el software Arlequin (versión 3.5.2.2.) se determinó la heterocigosidad esperada y el número de loci polimórficos de las tres localidades de las que se obtuvieron muestras en los años 2019 y 2020. En la ciudad de Esmeraldas, se encontraron cinco loci polimórficos (Poly-α, PfPK2, 2490, C2M34 y C3M69) todos con dos alelos. En San Lorenzo se encontraron tres loci polimórficos (PfPK2, C2M34 y C3M69) todos con dos alelos. En Tobar Donoso se observaron tres loci polimórficos (Poly-α, PfPK2 y 2490), al igual que en las otras dos poblaciones, todos poseían dos alelos (Tabla 4).

Tabla 4. Número de alelos por localidad de las muestras recolectadas en los años 2019 y 2020 en las provincias de Esmeraldas y Carchi.

Locus	Ciudad de Esmeraldas	San Lorenzo	Tobar Donoso
TA1	1	1	1
Poly-α	2	1	2
PfPK2	2	2	2
TA109	1	1	1
2490	2	1	2
C2M34	2	2	1
C3M69	2	2	1
Media	1.71	1.43	1.43
s.d.	0.49	0.54	0.54

San Lorenzo fue la localidad que mostró mayor heterocigosidad. En los tres marcadores polimórficos encontrados se observó una heterocigosidad de 0.66. En Tobar Donoso se observó una heterocigosidad de 0.209 en los marcadores Poly-α y PfPK2 y 0.325 en el marcador 2490. A pesar de que Esmeraldas fue la localidad con mayor número de alelos polimórficos fue la localidad con menor heterocigosidad (0.086). Los marcadores TA1 y TA109 mostraron una heterocigosidad nula en todas las localidades (Tabla 5).

Tabla 5. Heterocigosidad esperada de cada microsatélite en las diferentes localidades.

Locus	Esmeraldas	San Lorenzo	Tobar Donoso
TA1	0	0	0
Poly-α	0.087	0	0.209
PfPK2	0.095	0.667	0.209
TA109	0	0	0
2490	0.173	0	0.325
C2M34	0.087	0.667	0
C3M69	0.159	0.667	0
Media	0.086	0.286	0.106
s.d.	0.068	0.356	0.138

5.3.2. DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO

Se calculó el índice de asociación (I_A^S) para poder determinar el desequilibrio de ligamiento. Este cálculo se realizó de manera individual para cada una de las tres localidades estudiadas. En la ciudad de Esmeraldas el I_A^S fue de 0.224, en San Lorenzo fue de 0.3242 y en Tobar Donoso fue de 0.2263. El desequilibrio de ligamiento de todas las localidades fue media/alta, lo que indica que existen pocos eventos de recombinación y la endogamia es frecuente (Tabla 6).

Tabla 6. Desequilibrio de ligamiento calculado con el índice de asociación (I_A^S) en las diferentes localidades.

Localidad	Número de muestras	Índice de asociación (I_A^S)
Esmeraldas	24	0.224
San Lorenzo	4	0.3242
Tobar Donoso	18	0.2263

5.3.3. INDICES DE FIJACIÓN

Se utilizaron los índices de fijación (F_{st}) para medir la distancia genética entre las tres localidades. Los resultados de este análisis se obtuvieron con el software Arlequin v. 3.5.2.2. Los resultados de este análisis demostraron que la distancia genética de San Lorenzo en relación a Tobar Donoso y la ciudad de Esmeraldas es moderada (0.37 y 0.45 respectivamente), la distancia genética entre la ciudad de Esmeraldas y Tobar Donoso es muy alta (0.82) (Tabla 7).

Tabla 7. Distancia genética entre *P. falciparum* de localidades ecuatorianas (ciudad de Esmeraldas, San Lorenzo y Tobar Donoso) calculada mediante el índice de fijación (F_{st}).

	San Lorenzo*	**Tobar Donoso***	**Esmeraldas***	**Esmeraldas****	**San Lorenzo****	**Tobar Donoso****
San Lorenzo*	0					
Tobar Donoso*	0.37173	0				
Esmeraldas*	0.45047	0.81593	0			
Esmeraldas**	0.80579	0.85037	0.86423	0		
San Lorenzo**	0.19593	0.37892	0.41738	0.31203	0	
Tobar Donoso**	0.16488	0.41149	0.45932	0.3531	0.04205	0

*: muestras colectas en los años 2019 y 2020, **: muestras colectadas entre 2013 y 2016

5.3.4. RELACIÓN GENÉTICA ENTRE LOCALIDADES

Para determinar la relación genética entre las muestras estudiadas se utilizó el software Network, con el que se construyó una red basada en los haplotipos presentes. La red formada mostró la existencia de 11 haplotipos en los años 2019 y 2020. La baja diversidad genética del país se evidencia, ya que 21 de las 24 muestras colectadas en la ciudad de Esmeraldas se encuentran en un mismo haplotipo, 15 de las 18 muestras colectadas en Tobar Donoso se encuentran también en un mismo haplotipo, las muestras colectadas en San Lorenzo se encuentran en los haplotipos que contienen las muestras de la ciudad de

Esmeraldas y San Lorenzo, y 3 de los 11 haplotipos presentes corresponden a muestras provenientes de Colombia (Figura 2).

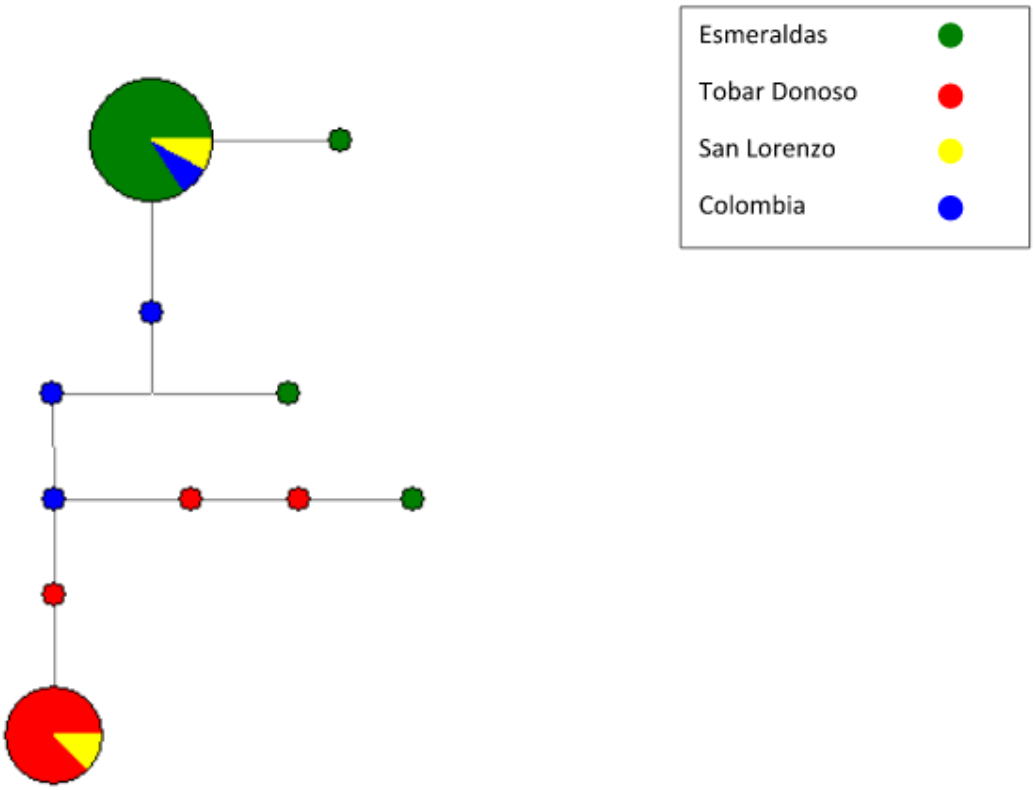


Figura 2. Distribución de haplotipos de *Plasmodium falciparum* en las localidades de ciudad de Esmeraldas, San Lorenzo, Tobar Donoso y Colombia en los años 2019 y 2020. Cada color representa una localidad y el diámetro de cada círculo es proporcional a la frecuencia de los haplotipos.

5.4. COMPARACIÓN DE LAS MUESTRAS COLECTADAS EN LOS AÑOS 2019-2020 CON MUESTRAS COLECTADAS EN EL PERÍODO 2013-2016

5.4.1. ANÁLISIS DE LA VARIANZA MOLECULAR (AMOVA)

Con el fin de comprender como se han modificado las poblaciones de *Plasmodium falciparum* durante los últimos años se compararon las muestras obtenidas en los años 2019 y 2020 con muestras obtenidas en las mismas localidades años atrás, entre 2013 y 2016 (Vera-Arias et al., 2019).

Utilizando los siete microsatélites antes descritos se elaboró una matriz en el software Arlequin v. 3.5.2.2. y con esto se realizó un análisis AMOVA para determinar el porcentaje de variación genética existente en las muestras colectadas. La variación se midió de dos maneras. Primero se calculó entre grupos, las muestras colectadas durante 2013-2016 comparadas con las muestras colectadas en los años 2019 y 2020. Posterior a esto se hizo un cálculo entre localidades, en el que se compararon las muestras de 6 localidades, ciudad de Esmeraldas, San Lorenzo y Tobar Donoso, las tres localidades en los dos períodos de tiempo mencionados.

El resultado del AMOVA demostró que la variación genética entre grupos (grupo 2013-2016 y grupo 2019-2020) es de 19.38%, la variación genética dentro de los grupos entre las localidades fue de 29.66% y la variación dentro de las localidades fue de 50.96% (Tabla 8).

Tabla 8. Resultados del análisis de la varianza molecular (AMOVA) realizado a las muestras obtenidas en Ecuador en los períodos 2013-2016 y 2019-2020.

Fuente de la variación	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	10.628	0.09892	19.38
Entre poblaciones dentro de grupos	15.460	0.15141	29.66
Dentro de poblaciones	39.021	0.26014	50.96
Total	65.109	0.51048	

El programa Arlequin calculó también los índices de fijación FST, FSC y FCT, estos índices se utilizan para calcular la proporción de la variabilidad genética. El FST consiste en la variabilidad genética dentro de las localidades, este valor fue igual a 0.49. El índice FSC estima la variabilidad genética dentro de los dos grupos (2013-2016 y 2019-2020), el valor para este análisis fue de 0.37. El último índice obtenido fue el FCT, que estima la variabilidad genética entre los dos grupos (2013-

2016 y 2019-2020), el resultado de este análisis fue de 0.19. El valor P de los índices FST y FSC fue de 0.00, mientras que el valor P del índice FCT fue de 0.10264 (Tabla 9).

Tabla 9. Índices de fijación obtenidos con el programa Arlequin

Índice	Valor	Valor-P
FSC	0.36790	0.00000
FST	0.49039	0.00000
FCT	0.19379	0.10264

5.4.2. RELACIÓN GENÉTICA ENTRE LOCALIDADES

Utilizando el programa Network, se realizó una segunda red de haplotipos en la que, además de las muestras colectadas durante 2019 y 2020 se incluyeron también a las muestras tomadas en la ciudad de Esmeraldas, San Lorenzo y Tobar Donoso en el período 2013-2016. En esta red se puede observar una mayor diversidad genética, ya que se observan más de 50 haplotipos. Sin embargo, se puede observar también que las muestras tomadas en los años 2019 y 2020 se encuentran distribuidas casi de la misma manera que en la red anterior, ya que las muestras de Tobar Donoso y la Ciudad de Esmeraldas forman dos haplotipos bien diferenciados en los que se encuentran las muestras provenientes de San Lorenzo en proporciones iguales. Además, se observa que las muestras colectadas en los años 2019 y 2020 se encuentran en la misma zona de la red, indicando una mayor relación entre ellas en comparación con las muestras colectadas en el período 2013-2016. Los haplotipos que más varían en esta red son los provenientes de las localidades de San Lorenzo y Tobar Donoso en 2013-2016 (Figura 3).

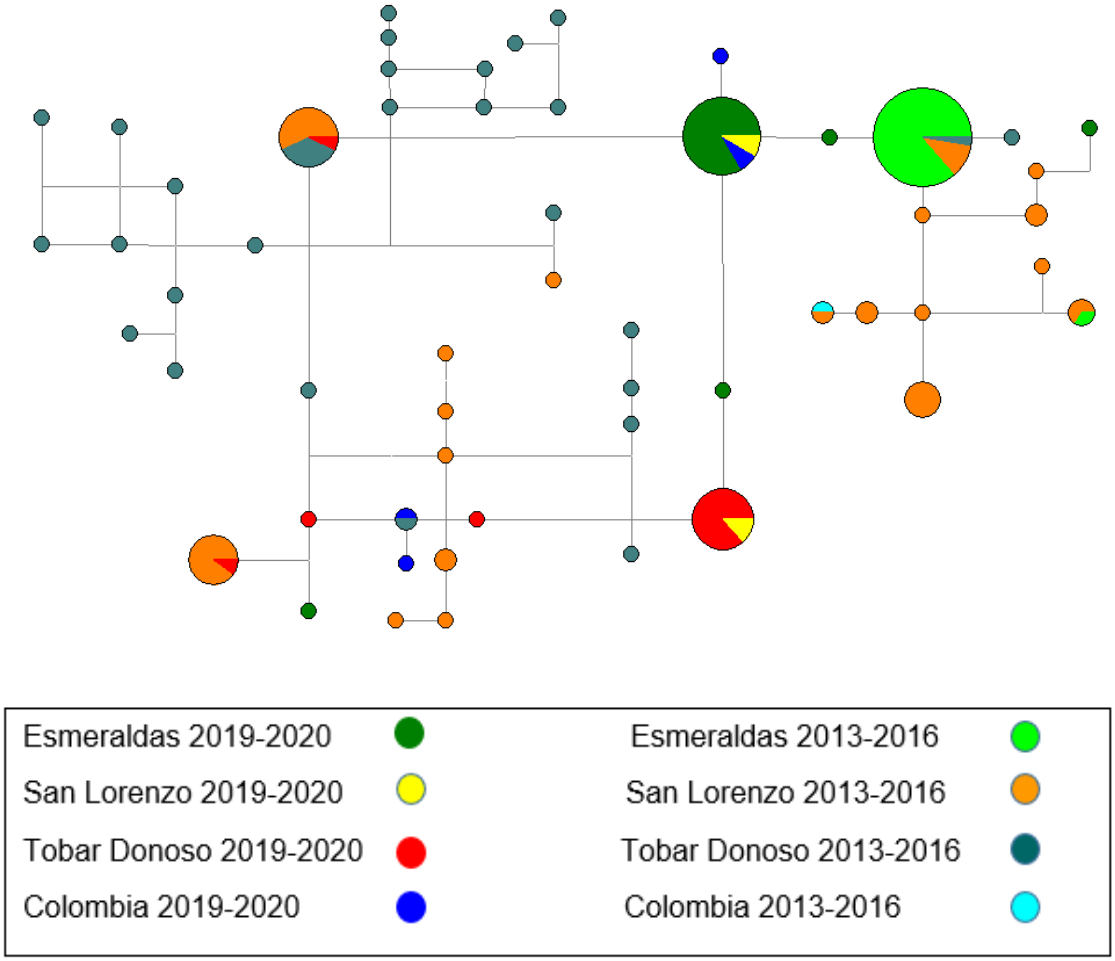


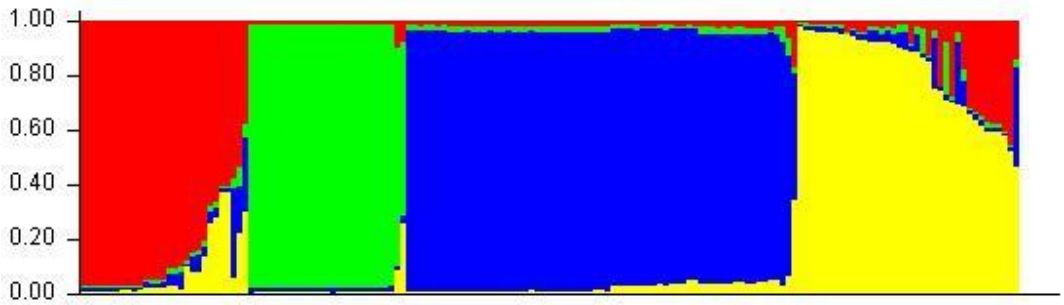
Figura 3. Red de haplotipos de muestras de *P. falciparum* en el período 2013-2016 comparadas con muestras colectadas en los años 2019 y 2020 en el noroeste de Ecuador. Las muestras fueron tomadas en la ciudad de Esmeraldas, San Lorenzo, Tobar Donoso y Colombia. Cada color representa una localidad y el diámetro de cada círculo es proporcional a la frecuencia de los haplotipos.

5.4.3. ESTRUCTURA POBLACIONAL DE *P. falciparum* EN ECUADOR

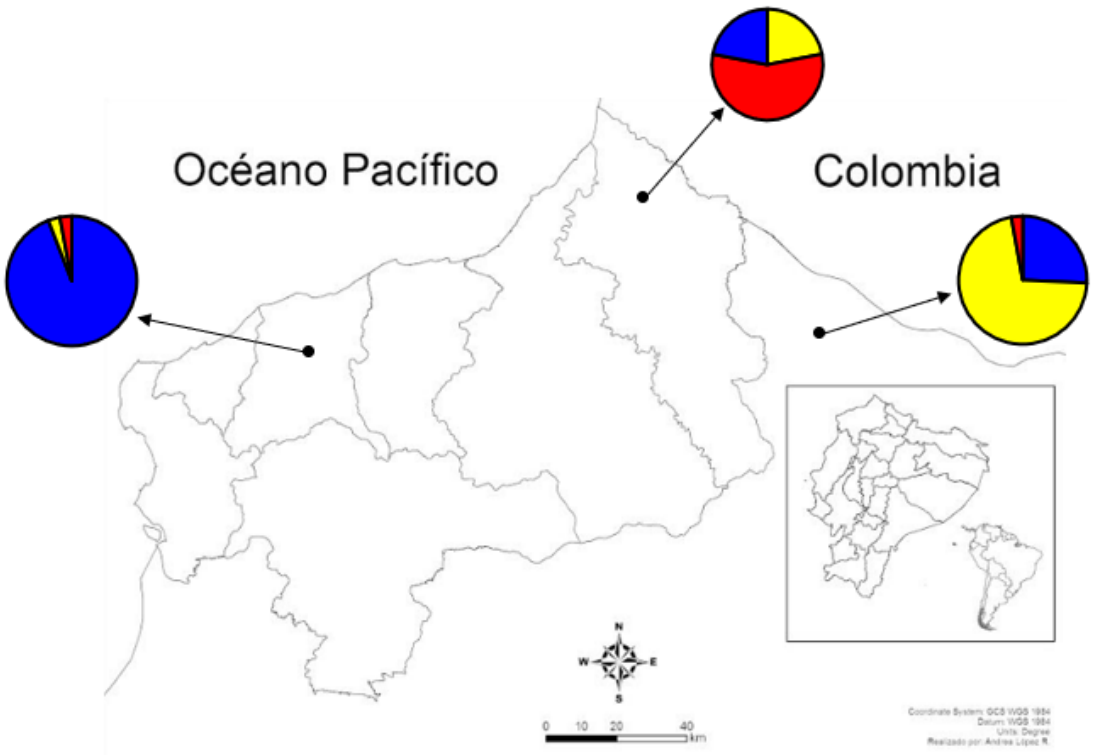
Para determinar el número más probable de poblaciones o grupos genéticos (K) y a qué grupo corresponde cada muestra se utilizó el software Structure (versión 2.3.4.), que se basa en análisis Bayesianos. El programa en línea *Structure Harvester* se utilizó para demostrar la K más probable. Para este análisis se utilizaron muestras colectadas en la ciudad de Esmeraldas, San Lorenzo y Tobar Donoso del período 2013-2016 y del período 2019-2020.

Para las muestras de Ecuador, *Structure Harvester* estableció la K=4 (Figura 4A). En el análisis se pueden observar 4 grupos genéticos, en el primer grupo se encuentran muestras de la ciudad de Esmeraldas y Tobar Donoso 2013-2016 en baja proporción (3% en ambas localidades), en mediana proporción (11%) muestras de Tobar Donoso 2019-2020 y en mayor proporción (56%) muestras de San Lorenzo 2013-2016. En el segundo grupo se observan únicamente muestras de la ciudad de Esmeraldas y San Lorenzo 2019-2020, este grupo representa el 92% de las muestras de la ciudad de Esmeraldas y el 50% de las muestras de San Lorenzo entre 2019 y 2020. En el tercer grupo se encuentran la mayoría de las muestras, se pueden observar que representan casi la totalidad de las muestras de la ciudad de Esmeraldas 2013-2016 (94%) y de Tobar Donoso 2019-2020 (83%). Además, se encuentran presentes también muestras de Tobar Donoso y San Lorenzo 2013-2016 (22% y 26% respectivamente) y representa la mitad de las muestras de San Lorenzo 2019-2020 (Figuras 4B y 4C).

A)


1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00

B)


Océano Pacífico
Colombia
N
W
E
S
0 10 20 40
km

C)

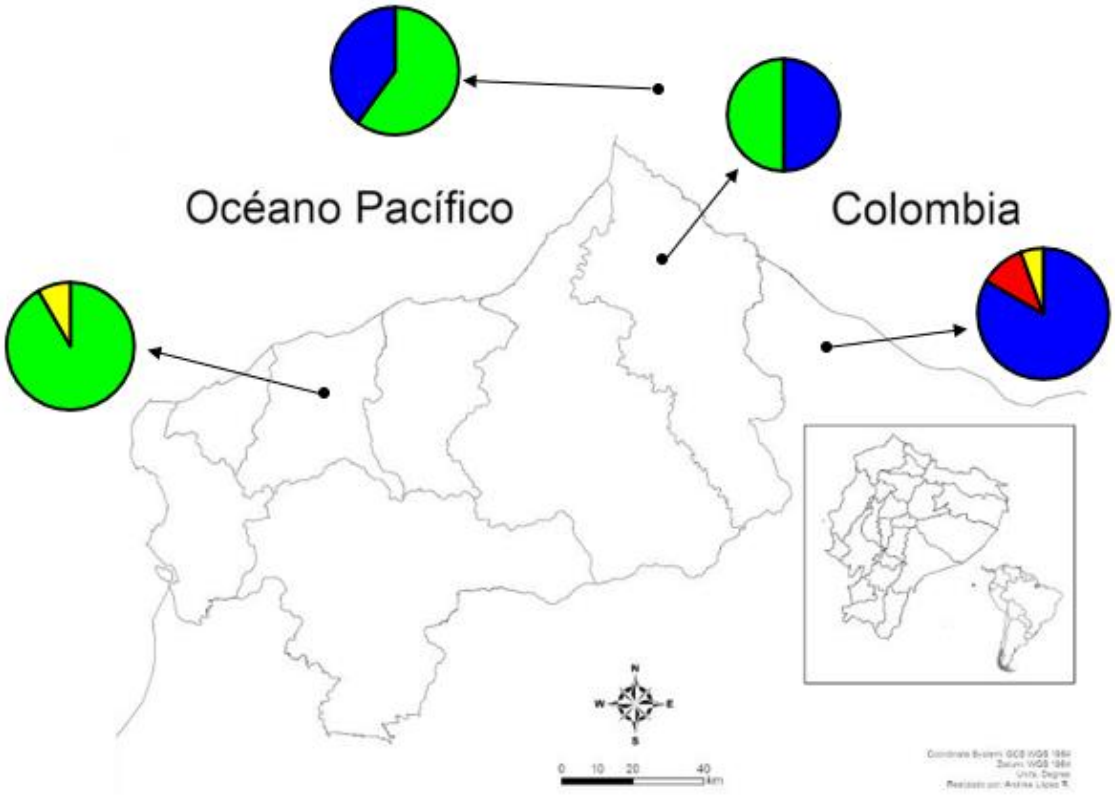


Figura 4. Distribución de grupos genéticos de *P. falciparum* asignados con el programa Structure versión 2.3.4 en muestras colectadas en las provincias de Esmeraldas y Carchi en Ecuador. A) Estimación del diagrama de barras de los coeficientes de grupos genéticos de *P. falciparum* (K=4, mejor ajuste con el conjunto de datos), resultados obtenidos con el programa Structure (Versión 2.3.4.) B) Muestras de Ecuador en el período 2013-2016. C) Muestras de Ecuador en el período 2019-2020. Cada color representa una población genética diferente. Al comparar ambos mapas se puede observar cómo han cambiado los parásitos circulando en la zona noroeste del país con el paso de los años.

5.5. COMPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE LOS BROTES DE 2012-2013 Y DE 2019-2020 EN LA CIUDAD DE ESMERALDAS

Se realizó una comparación de las muestras colectadas en la ciudad de Esmeraldas durante un brote ocurrido entre 2012 y 2013 y las muestras colectadas en el brote ocurrido en 2019 y 2020 (Figura 5A). Se realizó un cálculo de F_{st} utilizando el programa Arlequin. Se utilizó también el programa Structure para

determinar si las muestras de los brotes ocurridos en ambos períodos de tiempo pertenecen a un mismo grupo genético.

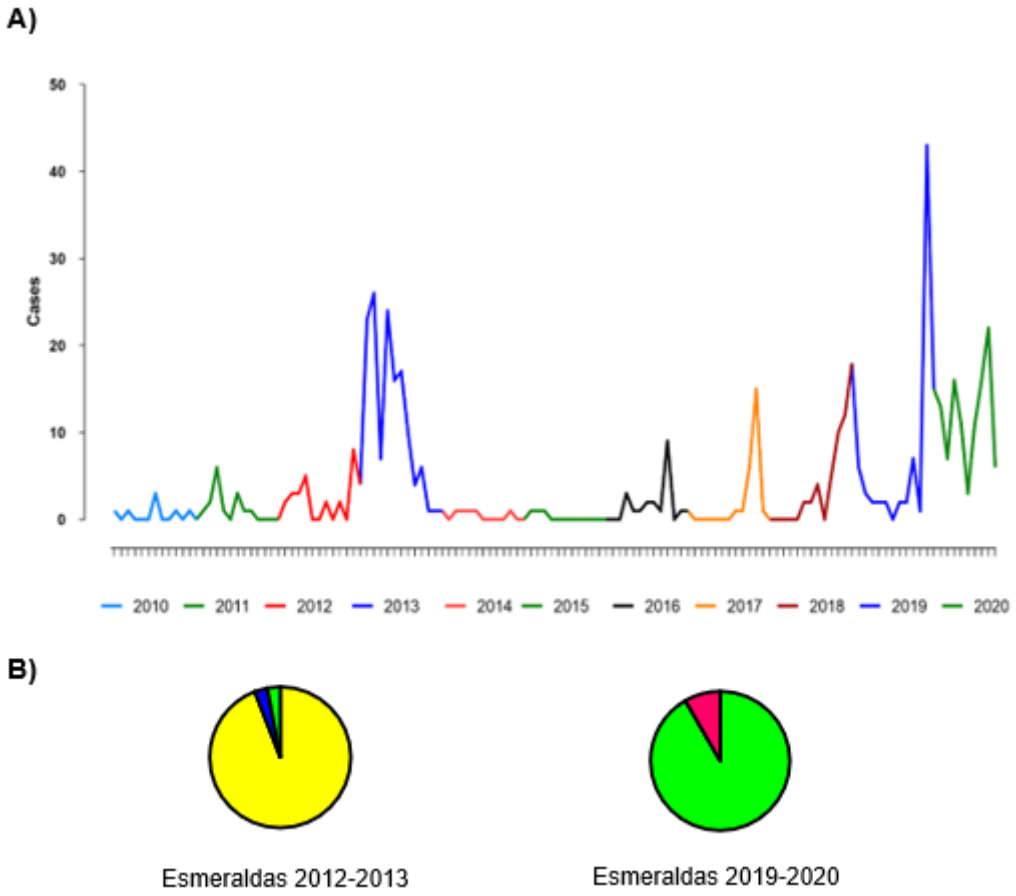


Figura 5. Infecciones producidas por *P. falciparum* en la ciudad de Esmeraldas desde 2010. A) Número de infecciones mensuales producidas por *P. falciparum* en la ciudad de Esmeraldas representadas por picos. B) Comparación de los grupos genéticos causantes de los brotes producidos en la ciudad de Esmeraldas entre 2013-2016 y 2019-2020 obtenidos mediante el programa Structure.

El resultado del índice de fijación F_{st} fue de 0.86, lo que indica que la distancia genética de los parásitos en ambos períodos de tiempo es alta (Tabla 7). De la misma manera, el resultado obtenido en Structure indica que casi la totalidad de las muestras colectadas en los años 2019 y 2020 pertenecen al segundo grupo genético (Figura 4C), mientras que, las muestras colectadas durante el brote ocurrido entre 2012 y 2013 (Figuras 4B y 5B) pertenecen casi en su totalidad al

tercer grupo genético. Ambos períodos de tiempo comparten un mínimo porcentaje de muestras en el tercer grupo genético, en el caso de las muestras obtenidas durante 2012 y 2013 una muestra pertenece al cuarto grupo genético, en el caso de las muestras obtenidas durante 2019 y 2020 dos muestras pertenecen al cuarto grupo genético (Figura 5B).

La heterocigosidad esperada que se obtuvo de las muestras del brote en la ciudad de Esmeraldas ocurrido entre 2012 y 2013 fue de 0.035 y el desequilibrio de ligamiento de 0.43, mientras que la heterocigosidad del brote de los años 2019 y 2020 fue de 0.086 y el desequilibrio de ligamiento de 0.22.

5.6. COMPARACIÓN ENTRE *Plasmodium falciparum* ECUATORIANOS Y DE PAÍSES VECINOS

Se utilizó el programa Arlequin para calcular el índice de fijación F_{st}, y así medir las distancias genéticas entre las muestras colectadas en los años 2019 y 2020 y muestras colectadas en Perú y Colombia. Las muestras del Ecuador se compararon con muestras obtenidas en Colombia de las localidades de Nariño y Valle entre 2008 y 2009 (Murillo et al., 2015) y muestras obtenidas en la costa y el oeste de la Amazonía peruana en el período 1999 y 2001 (Griffing et al., 2011) (Tabla 10).

Tabla 10. Distancia genética entre las localidades ecuatorianas ciudad de Esmeraldas, San Lorenzo y Tobar Donoso (2019-2020) comparadas con localidades colombianas y peruanas calculada mediante los índices de fijación (F_{st})

	San Lorenzo*	Tobar Donoso*	Esmeraldas*	Colombia*	Costa peruana[G]	Oeste Amazonía Peruana[G]	Nariño[M]	Valle[M]
San Lorenzo*	0							
Tobar Donoso*	0,26227	0						
Esmeraldas*	0,45047	0,7713	0					
Colombia*	0,20792	0,50129	0,63762	0				
Costa peruana[G]	0,52783	0,61834	0,68415	0,45468	0			
Oeste Amazonía Peruana[G]	0,64471	0,71639	0,80314	0,54597	0,60259	0		
Nariño[M]	0,15881	0,33486	0,42158	0,08133	0,33597	0,35373	0	
Valle[M]	0,13899	0,33275	0,42918	0,06004	0,33461	0,35309	0,04839	0

*: muestras colectadas en los años 2019 y 2020, G: muestras provenientes de Perú a finales del siglo XX estudiadas por Griffing et al. (2011), M: muestras provenientes de Colombia en los años 2008 y 2009 estudiadas por Murillo et al. (2015)

Este análisis reveló que las muestras colectadas en los años 2019 y 2020 en la ciudad de Esmeraldas no son genéticamente cercanas a las muestras provenientes de la Amazonía oeste y costa de Perú colectadas entre 1999 y 2000 y a las muestras de Nariño y Valle colectadas entre 2008 y 2009 en Colombia. De acuerdo con el índice F_{st} las muestras de Nariño y Valle poseen valores que indican que existe distancia genética (0.42 y 0.43 respectivamente) en relación con las muestras de la ciudad de Esmeraldas, seguidos de Colombia en la actualidad (0.64) para finalizar con las muestras de Perú, que muestran una alta distancia genética, 0.68 en las muestras obtenidas de la costa peruana y 0.8 en las muestras obtenidas en la Amazonía peruana.

Las muestras colectadas en San Lorenzo en los años 2019 y 2020 poseen una mayor cercanía genética con las muestras provenientes de Nariño y Valle en Colombia en el período 2013-2016 (0.16 y 0.14 respectivamente), seguido de Colombia en la actualidad (0.21). La localidad con más distancia genética de San Lorenzo fue el oeste de la Amazonía peruana en 1999-2001(0.64) seguido de la costa peruana (0.53).

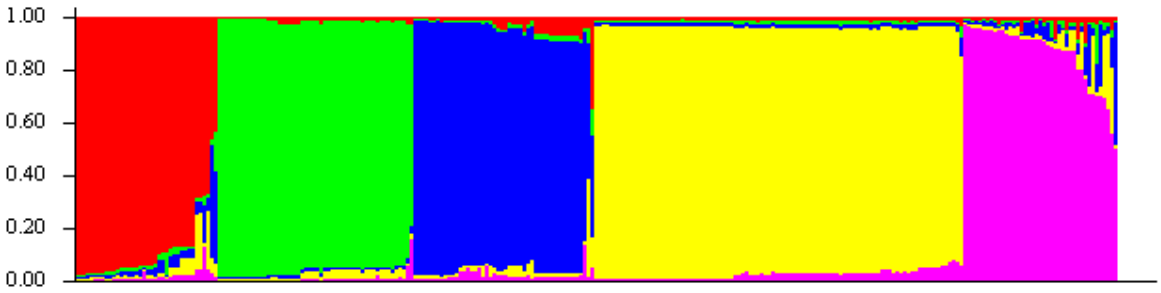
En las muestras de Tobar Donoso de los años 2019 y 2020 se pudo observar que esta localidad tiene parásitos genéticamente distantes del resto de localidades, al igual que en la ciudad de Esmeraldas, las localidades con mayor cercanía genética a Tobar Donoso fueron Nariño y Valle en los años 2013-2016 (0.33 para ambas localidades) seguido de Colombia en la actualidad (0.5) que como se puede evidenciar presentan valores bastante elevados. La localidad más alejada genéticamente de Tobar Donoso en estos años fue el oeste de la Amazonía peruana en 1999-2001 (0.72). En ambos brotes se observó que los microsatélites TA1 y TA109 presentaron una heterocigosidad nula.

5.6.1. ESTRUCTURA POBLACIONAL DE *Plasmodium falciparum* EN ECUADOR PERÚ Y COLOMBIA

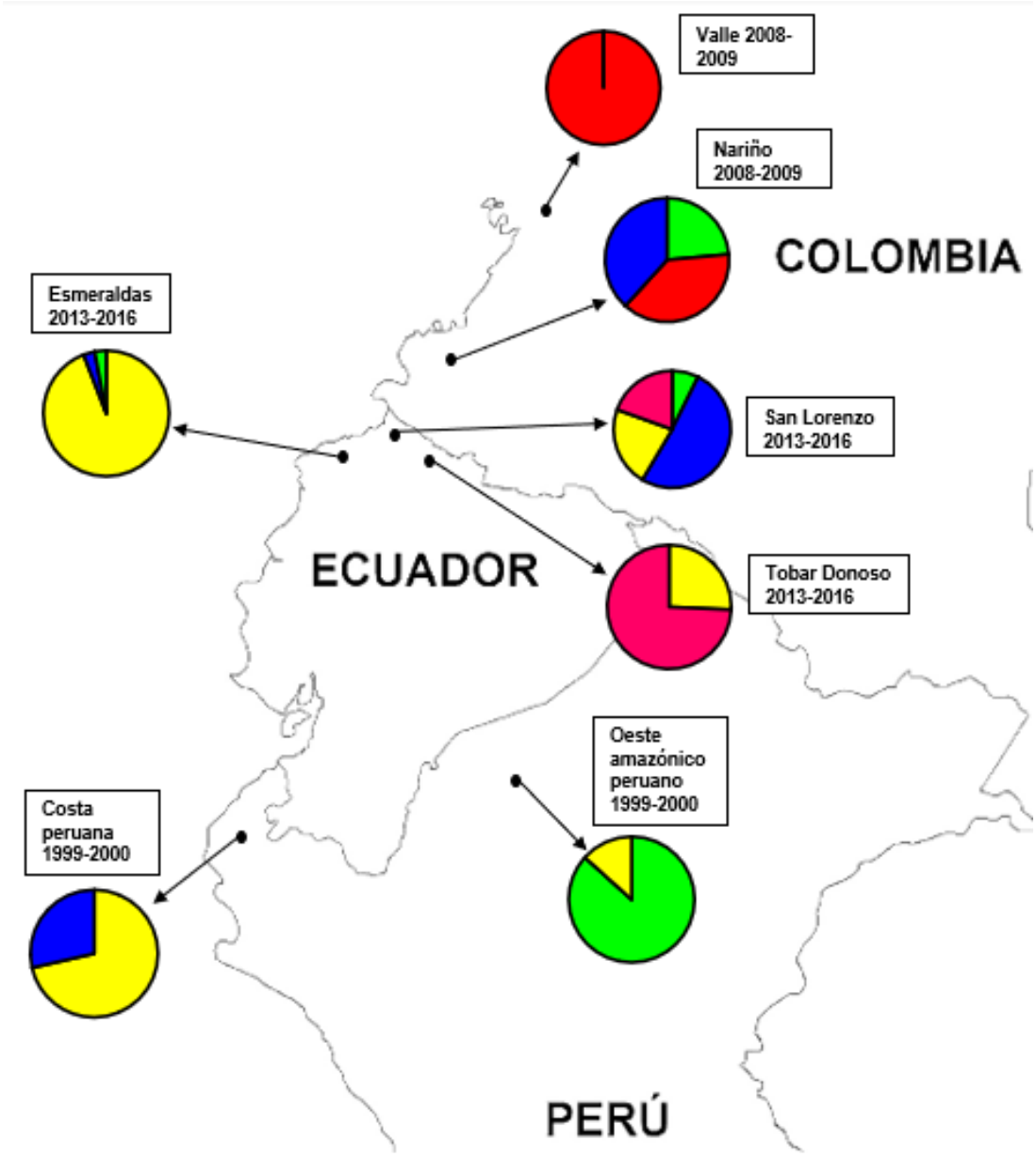
Al igual que con las muestras ecuatorianas para este análisis se utilizó el software Structure y se determinó la K ideal en Structure Harvester, que en este caso fue K=5 (Figura 6A). En el análisis realizado con las muestras de Perú,

Colombia y Ecuador se pueden observar 5 grupos genéticos (Figura 6B y 6C). En el primer grupo, representado en color rojo, no se observan muestras procedentes de las localidades ecuatorianas en los años 2019 y 2020, se observan únicamente muestras procedentes de las localidades de Nariño y Valle en Colombia en proporciones de 38% y 100% respectivamente. En el segundo grupo, representado en color verde, se encuentran el 92% de las muestras de la ciudad de Esmeraldas, el 50% de las muestras de San Lorenzo, el 87% de las muestras del oeste de la Amazonía peruana, el 24% de las muestras de Nariño de los años 2008-2009 y el 60% de las muestras de Nariño de los años 2019-2020, siendo este el grupo genético que más cantidad de muestras abarca. En el tercer grupo, representado en color azul, se pueden observar el 6% de las muestras de Tobar Donoso, el 38% de muestras de Nariño en Colombia y el 29% de las muestras de la costa peruana. En el cuarto grupo, representado en color amarillo, se encuentran la mayoría (78%) de las muestras de Tobar Donoso, se observan también un número significativo (50%) de muestras de San Lorenzo y muestras de Perú, 71% de las muestras de la costa peruana y 13% de las muestras del oeste de la Amazonía peruana. En el quinto y último grupo, representado en color rosado, se encuentran el 17% de las muestras de Tobar Donoso, el 8% de las muestras de la ciudad de Esmeraldas y el 40% de las muestras de Nariño de los años 2019 y 2020 (Figura 6C).

A)



B)


Valle 2008-2009
Nariño 2008-2009
COLOMBIA
Esmeraldas 2013-2016
San Lorenzo 2013-2016
ECUADOR
Tobar Donoso 2013-2016
Oeste amazónico peruano 1999-2000
Costa peruana 1999-2000
PERÚ

C)

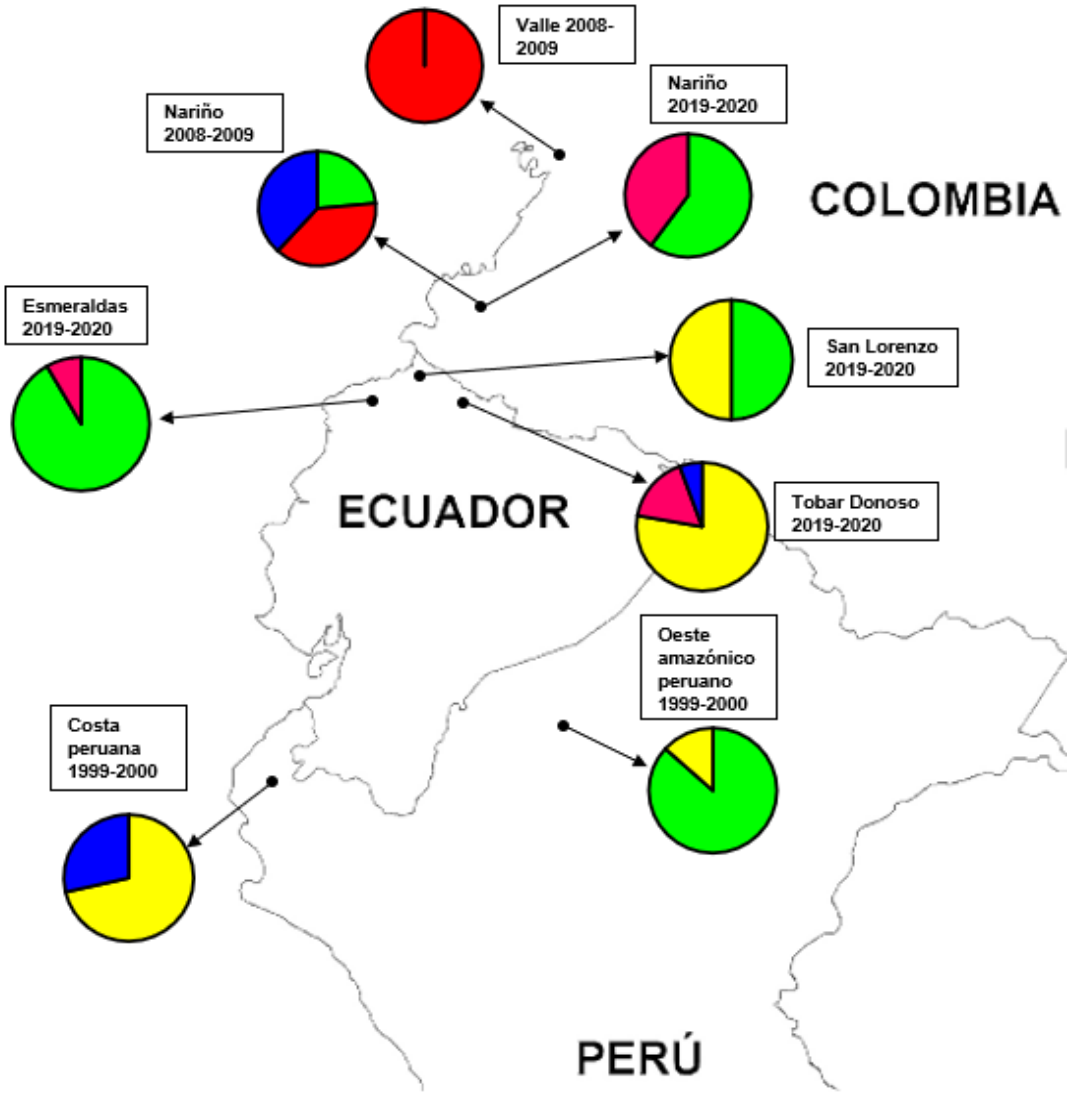


Figura 6. Distribución de los grupos genéticos asignados con el programa Structure versión 2.3.4 en muestras colectadas en Ecuador, Colombia y Perú. A) Estimación del diagrama de barras de los coeficientes de grupos genéticos de *P. falciparum* (K=4, mejor ajuste con el conjunto de datos), resultados obtenidos con el programa Structure (Versión 2.3.4.) B) Muestras colectadas en Ecuador entre 2013 y 2016 en comparación con muestras colectadas en Perú entre 1999 y 2001 (Griffing et al., 2011) y Colombia en el período 2008-2009 (Murillo et al., 2015). C) Muestras colectadas en Ecuador en los años 2019 y 2020 en comparación con muestras provenientes de Perú entre 1999-2001 (Griffing et al., 2011) y Colombia entre 2008-2009 (Murillo et al., 2015) y 2019-2020 (este estudio).

6. DISCUSIÓN

La infección producida por *Plasmodium falciparum* es la forma de malaria más común y la que causa más muertes a nivel mundial (WHO, 2020a). Afortunadamente en el Ecuador la infección por *P. falciparum* representa un porcentaje notablemente inferior del total de casos respecto a las infecciones producidas por *P. vivax* y la mayoría de dichos casos se reportan principalmente en las provincias de Esmeraldas y Carchi (208 de los 268 casos de *P. falciparum* reportados en 2019), al noroeste del país en la frontera con Colombia (MSP, 2019; WHO, 2020b). En el presente estudio se utilizaron 55 muestras de sangre con infecciones producidas por *P. falciparum*, de las cuales 46 muestras provenientes de tres localidades ecuatorianas: 31 muestras pertenecieron a dos localidades, ciudad de Esmeraldas y San Lorenzo, en la provincia de Esmeraldas y 18 muestras provinieron de una localidad, Tobar Donoso, en la provincia del Carchi. Las cinco muestras restantes fueron de casos provenientes de la localidad de Nariño en Colombia que fueron diagnosticados en el Ecuador. Cuatro muestras no fueron utilizadas en los análisis ya que no se observaron resultados en la amplificación de varios microsatélites. Las muestras fueron colectadas en los años 2019 y 2020 y con estas muestras se realizó una caracterización molecular (Tabla 1). Para los análisis realizados se separaron las muestras en las cuatro localidades mencionadas, ciudad de Esmeraldas, San Lorenzo, Tobar Donoso y Colombia (Figura 1).

6.1. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *P. falciparum* ECUATORIANOS DURANTE LOS AÑOS 2019 Y 2020

En el presente estudio se utilizaron marcadores moleculares microsatelitales con el fin de caracterizar molecularmente las poblaciones de *P. falciparum* circulando en la actualidad en la zona noroeste del país y así comprender la estructura poblacional de las mismas, su origen, como han variado a lo largo del tiempo y su relación con parásitos de países vecinos.

Se utilizaron siete microsatélites, cinco de ellos (TA1, Poly-α, PfPK2, TA109 y 2490) descritos en los estudios de Anderson et al., (1999) y Anderson et al.,

(2000), los dos microsatélites restantes (C2M34 y C3M69) fueron descritos por Abdallah et al., (2015). Se usaron estos siete microsatélites (Tabla 2) ya que éstos han sido utilizados con anterioridad en estudios del país y de la región, esto permite comparar los resultados obtenidos en diferentes localidades y así tener un panorama general de lo que ocurre con el parásito tanto a nivel regional como local (Griffing et al., 2011; Echeverry et al., 2013; Abdallah et al., 2015; Baldeviano et al., 2015; Obaldia et al., 2015; Sáenz et al 2015; Dorado et al., 2016).

El tamaño de los fragmentos amplificados se determinó mediante la lectura de espectroferogramas generados por el software Peak Scanner v. 1.0., en donde se observó el pico más alto. Ninguna muestra presentó dos picos, lo que indica que ninguna de las muestras extraídas presentó multiclonalidad (infección múltiple) (Orjuela-Sánchez et al., 2013). Las muestras Pf085, Pf105, Pf108 y Pf120 no presentaron resultados en tres o más microsatélites por lo que no fueron utilizadas en los análisis realizados posteriormente.

6.2. DIVERSIDAD GENÉTICA DE *P. falciparum* EN LOS AÑOS 2019 Y 2020

Con el fin de determinar la diversidad genética de los parásitos de *P. falciparum* presentes en las localidades de ciudad de Esmeraldas, San Lorenzo y Tobar Donoso se realizaron varios análisis con los resultados obtenidos durante la caracterización molecular con los siete microsatélites antes mencionados.

El cálculo de la heterocigosidad esperada y el polimorfismo de cada microsatélite fueron algunos de los análisis realizados. El polimorfismo consiste en el número de alelos presentes en un locus determinado para la población. En el caso de este estudio, cada microsatélite corresponde a un locus (National Human Genome Research Institute, s.f.). La heterocigosidad es la medida en la que varía una población o grupo de individuos respecto a un locus (Branch et al., 2011). La localidad de San Lorenzo fue la que presentó mayor heterocigosidad esperada (0.286) en relación con la ciudad de Esmeraldas (0.086) y Tobar Donoso (0.106). La mayor heterocigosidad en San Lorenzo puede explicarse gracias a su ubicación geográfica, ya que esta localidad está en la frontera con Colombia, por lo que es una zona donde existe migración, tanto dentro como fuera del país y, por ende, una

mayor transmisión del parásito (Vera-Arias et al., 2019). Los resultados obtenidos de la heterocigosidad esperada en la ciudad de Esmeraldas y Tobar Donoso sugieren que la diversidad genética en la zona noroeste del Ecuador es baja, ya que la heterocigosidad esperada y la diversidad genética son directamente proporcionales, y como se puede observar ninguna de las dos localidades presenta valores elevados. Estos resultados concuerdan con lo reportado en otros estudios realizados en Ecuador y en países latinoamericanos como Perú, Colombia y Panamá en los que indican que existe poca diversidad de *P. falciparum* en esta región debido a la baja tasa de transmisión de los parásitos, cuellos de botella poblacionales y estrategias de control, circunstancias que reducen posibles eventos de recombinación, ya que en la mayoría de infecciones no se observa multiplicidad de infección, es decir que las infecciones son producidas generalmente por un solo clon del parásito, se observa además, que en las localidades de Tobar Donoso y ciudad de Esmeraldas hay un grupo genético dominante en cada una de ellas (Figura 4C), esto implica que en ambas localidades los brotes producidos se deben a expansiones clonales como se ha reportado en varias zonas de América Latina (Griffing et al., 2011; Echeverry et al., 2013; Obaldia et al., 2015; Sáenz et al., 2015; Knudson et al., 2020).

Los análisis realizados posteriormente en los programas LIAN y Network confirman lo observado en los resultados de la heterocigosidad esperada. El desequilibrio de ligamiento se utilizó para medir la tasa de recombinación y la endogamia de las muestras estudiadas, este análisis fue realizado en el software en línea LIAN v. 3.7 (Haubold y Hudson, 2000). Este índice se mide de 0 a 1, mientras más cercano a uno se encuentre una población, menor será la tasa de recombinación y, por ende, mayor endogamia entre individuos (Oliva et al, 2004). Un alto desequilibrio de ligamiento es indicador de baja diversidad genética y en el caso de la malaria esto puede darse por bajas tasas de transmisión, ya que esto provoca escasos efectos de recombinación (Anderson et al., 2000). Los resultados obtenidos al calcular el índice de asociación estándar (I^S_A) en las localidades de ciudad de Esmeraldas y Tobar Donoso fueron de 0.224 y 0.2263 respectivamente, valores que indican que la tasa de recombinación fue poco frecuente en estas localidades y que la endogamia en las mismas fue elevada, situaciones comunes en zonas de poca diversidad (Knudson et al., 2020). Los resultados de la localidad

de San Lorenzo fueron de 0.3242, el valor más alto observado entre las tres localidades estudiadas lo que indica una mayor endogamia y menor tasa de recombinación, esto posiblemente se debe a que hay pocos clones circulando en la zona en 2019 y 2020, producto de su ubicación geográfica en la frontera con Colombia (Vera-Arias et al., 2019), sin embargo, esto no se puede afirmar con seguridad debido al reducido número de muestras colectadas en la localidad de San Lorenzo.

Utilizando el programa Network v. 10.0. se crearon diagramas de nexo (Figura 2). Dichos diagramas crean redes en las que agrupan muestras con haplotipos similares y son de suma utilidad para observar la relación genética existente entre varias localidades. La red resultante mostró un total de 11 haplotipos de los cuales nueve están conformados por únicamente una muestra en relación con dos haplotipos que agrupan la mayoría de las muestras. En uno de los haplotipos con una alta frecuencia de muestras se pueden observar casi en su totalidad muestras provenientes de la localidad de Tobar Donoso y dos de muestras de la localidad de San Lorenzo. Lo mismo se observa en el segundo haplotipo que agrupa dos muestras provenientes de Colombia, dos muestras de San Lorenzo y en su gran mayoría está conformado por muestras obtenidas de la ciudad de Esmeraldas (Figura 2).

El hecho de que muestras de la ciudad de Esmeraldas, San Lorenzo y Colombia se encuentren agrupadas en un mismo haplotipo es de suma importancia, ya que explica el origen de los parásitos de *P. falciparum* causantes del brote en la ciudad de Esmeraldas, parásitos que ingresaron al país debido a la migración humana que ocurre de manera frecuente en la frontera con Colombia, entre San Lorenzo y Nariño, como ha sido sugerido en estudios anteriores (Vera-Arias et al., 2019). Esto se ve confirmado al observar los perfiles de microsatélites de las tres localidades que son idénticos y las fechas de colección de las muestras colombianas en la tabla 1 donde se observa que la primera de las cinco muestras procedentes de Colombia fue diagnosticada el 24 de junio, la segunda el 20 de agosto y la tercera el seis de octubre, las dos muestras provenientes de San Lorenzo que poseen un haplotipo idéntico fueron colectadas el cuatro de abril y el seis de junio del 2019, el brote en la ciudad de Esmeraldas empezó en octubre del

2019 y la primera muestra colectada del brote en la ciudad de Esmeraldas corresponde al 17 de diciembre del mismo año.

6.3. COMPARACIÓN DE LAS MUESTRAS COLECTADAS EN LOS AÑOS 2019-2020 CON MUESTRAS COLECTADAS EN EL PERÍODO 2013-2016 EN EL NOROESTE DEL ECUADOR

Con el fin de determinar si los grupos genéticos de *P. falciparum* en el país siguen siendo los mismos que años atrás, y en que porcentajes se encuentran circulando grupos genéticos de años pasados, se realizó una comparación de las muestras obtenidas en los años 2019 y 2020 con muestras obtenidas en las mismas localidades en años atrás, en el período 2013-2016. Para esto se utilizaron 161 muestras, 52 de los años 2019 y 2020 y 109 del periodo 2013-2016. Con estas muestras se realizó: I) análisis de la varianza molecular (AMOVA), II) índices de fijación, III) diagrama de nexo y IV) análisis de estructura poblacional de las localidades.

Los resultados obtenidos en el análisis AMOVA demuestran que la variación molecular se encuentra distribuida principalmente dentro de los dos grupos establecidos previamente (muestras del período 2013-2016 y muestras del período 2019-2020) (50.96%) y en un menor porcentaje entre los grupos (29.66%) y entre subgrupos (todas las localidades en ambos períodos de tiempo) (19.38%) (Tabla 8). Los resultados de los índices de fijación fueron de 0.49, 0.37 y 0.19 para los estadísticos FST, FSC y FCT respectivamente (Tabla 9), los dos primeros valores significativos, lo que indica que a nivel estadístico existe diferencia genética entre las tres localidades estudiadas, así como entre aislados de *P. falciparum*. Estos resultados parecen indicar que a pesar de que en el país aún se observa una baja diversidad genética, los parásitos circulando en la actualidad (2019 y 2020) no son los mismos que se encontraban circulando en la zona entre 2013 y 2016. Sin embargo, en los resultados obtenidos con el programa Structure (Figura 4A) se observó con claridad que en el período 2013-2016 tres grupos genéticos de *P. falciparum* se encontraban circulando en la zona noroeste del país, los grupos rojo azul y amarillo, todos presentes en las tres localidades en mayor o menor medida. Los mismos tres grupos se encuentran presentes en el período 2019-2020, no

obstante, como se puede observar el grupo azul se encuentra circulando en Tobar Donoso y San Lorenzo, el amarillo en Tobar Donoso y la ciudad de Esmeraldas y el rojo únicamente en Tobar Donoso (Figuras 4B y 4C). Adicionalmente, se observa un grupo nuevo que es el verde y es el que ocupa aproximadamente el 90% de las muestras de Esmeraldas y el 50% de las muestras de San Lorenzo. De esta forma se puede afirmar que existe únicamente un grupo genético nuevo de parásitos circulando en la zona noroeste del país y que los parásitos que se encontraban circulando entre 2013 y 2016 siguen siendo similares a los que circulan en los años 2019 y 2020, lo que indica un posible evento de recombinación o el ingreso de parásitos similares desde la frontera con Colombia, además, el cambio en las proporciones en las que se presenta cada grupo genético en las tres localidades explica la alta distancia genética observada en los resultados del AMOVA.

El hecho de que los grupos genéticos presentes en el país en la actualidad sean similares a los que se encontraban circulando hace varios años es de suma importancia ya que, de acuerdo con Knudson et al., (2020), esto es común en zonas de baja diversidad como Latinoamérica, ya que existen pocos eventos de recombinación, por ende, las pocas poblaciones genéticas de parásitos existentes permanecen bien diferenciadas entre sí y esto se mantiene así por largos períodos de tiempo.

6.4. COMPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE LOS BROTES OCURRIDOS EN LA CIUDAD DE ESMERALDAS EN LOS PERÍODOS 2013-2016 Y 2019-2020

En Ecuador todavía ocurren brotes de manera habitual, tanto de infecciones producidas por *P. falciparum* como de *P. vivax*. La provincia de Esmeraldas es conocida históricamente por ser un área de alta transmisión de *P. falciparum* (Figura 5A) (Sáenz et al., 2015). Las muestras utilizadas en este estudio provenientes de la ciudad de Esmeraldas pertenecen a un brote ocurrido en la ciudad durante los años 2019 y 2020 y las muestras con las que fueron comparadas provienen de un brote ocurrido en el mismo lugar, pero en los años 2012 y 2013 (Figura 5B) (Sáenz et al., 2015).

Los resultados obtenidos en el análisis realizado del índice de fijación F_{st} indicaron que la distancia genética de las muestras colectadas en la ciudad de Esmeraldas en la actualidad en relación con las muestras colectadas en Esmeraldas durante 2013-2016 es muy alta (0.86) (Tabla 7). Esto puede explicarse por la naturaleza clonal de las muestras de años pasados ya, que los estudios realizados a las muestras colectadas durante el brote ocurrido entre 2012 y 2013 determinaron que a excepción de una muestra todas poseían un genoma casi idéntico, es decir fue un brote de naturaleza clonal (Sáenz et al., 2015). De la misma manera, el perfil de los microsatélites de la mayoría de las muestras colectadas en los años 2019 y 2020 es clonal, único y es distinto al reportado en 2013-2016. La diferencia entre los perfiles de ambos períodos de tiempo se encuentra en los microsatélites C2M34 y C3M69, las muestras colectadas entre 2013 y 2016 poseen tamaños de fragmento de 226 y 140 pares de bases respectivamente, mientras que los de las muestras de los años 2019 y 2020 poseen tamaños de 234 y 124 pares de bases respectivamente.

Al observar el perfil de los microsatélites de las muestras obtenidas en el brote que inicio en octubre del año 2019 en la ciudad de Esmeraldas se puede observar que es idéntico a las muestras procedentes de Colombia colectadas en el Ecuador entre julio y diciembre del 2019, pocos meses antes del brote, también es idéntico al 50% de las muestras de la localidad de San Lorenzo colectadas antes del brote, por lo que se puede afirmar con seguridad que este brote fue producido por *P. falciparum* procedentes de Nariño en Colombia y que ingresaron al país a través de la localidad fronteriza de San Lorenzo gracias a la migración humana que ocurre de forma regular en estas áreas (Vera-Arias et al., 2019).

Además, es importante notar que los parásitos estudiados en el brote de la ciudad de Esmeraldas en 2019 y 2020 están muy relacionados con los parásitos del linaje clonal EV1, parásitos provenientes de Antioquia en el norte del territorio colombiano descritos por Dorado et al. (2016) en un estudio realizado a muestras obtenidas entre 2011 y 2012. Al comparar los perfiles de microsatélites de los parásitos de la ciudad de Esmeraldas con los de Antioquia se observa que son casi idénticos, únicamente existe una ligera variación en el microsatélite 2490, en el que las muestras de la cuidad de Esmeraldas presentan 72 pares de bases y las de

Antioquia 74 pares de bases, diferencias no muy grandes que pueden ser producto de una normalización de datos diferente, lo que indica que no existen diferencias significativas entre las muestras de los dos lugares. Esto sugiere que los parásitos provenientes de Antioquia migraron hacia el sur por la costa colombiana hasta Nariño causando el brote de la ciudad de Esmeraldas ocurrido en 2019 y 2020.

6.5. COMPARACIÓN ENTRE *Plasmodium falciparum* ECUATORIANOS Y DE PAÍSES VECINOS

Se compararon las muestras utilizadas en este estudio con muestras de infecciones diagnosticadas en Perú entre 1999 y 2000 en un estudio realizado por Griffing et al., (2011) y muestras de infecciones diagnosticadas entre 2008 y 2009 en Colombia que fueron estudiadas por Murrillo et al., (2015). Esto se realizó con el fin de determinar el origen de las muestras circulando en el noroeste ecuatoriano en los años 2019 y 2020. En total se utilizaron los datos de 277 muestras, 59 muestras reportadas por Murilo et al., (2015), de las localidades de Nariño y Valle en Colombia, 57 muestras de la costa y el oeste de la Amazonía peruana reportadas por Griffing et al., (2011), y las 161 muestras colectadas en Ecuador ya mencionadas.

Con estas muestras se realizó un análisis con el software Structure. En los resultados obtenidos con este análisis el número de poblaciones ideales fue de K=5 (Figura 6A). En la Figura 6C se puede observar que las muestras colectadas en el brote de la ciudad de Esmeraldas en los años 2019 y 2020 se encuentran en el mismo grupo genético (verde) que las muestras colectadas entre 2008 y 2009 estudiadas por Murillo et al., (2015) en Nariño y las muestras procedentes de Colombia diagnosticadas en Ecuador entre 2019 y 2020, este grupo genético también se encuentra presente en las muestras del oeste de la Amazonía peruana colectadas entre 1999 y 2000 estudiadas por Griffing et al., (2011).

El grupo genético predominante en las muestras colectadas en Tobar Donoso en los años 2019 y 2020 es el amarillo (Figura 6C) que como se puede observar también es el grupo predominante en las muestras de la costa peruana a finales del siglo XX estudiadas por Griffing et al., (2011) y representa también la

mitad de las muestras de San Lorenzo. Si comparamos el perfil de los microsatélites de estos grupos se puede observar que son casi idénticos, la única variación existente se encuentra en el microsatélite PfPK2, en el que las muestras peruanas presentan 174 pares de bases y las muestras de Tobar Donoso 189 pares de bases. Este grupo genético posee un perfil microsatelital casi idéntico a los parásitos causantes del brote de la ciudad de Esmeraldas en los años 2012 y 2013, al igual que con las muestras de Perú, existe una diferencia en el número de pares del microsatélite PfPK2, en donde las muestras de la ciudad de Esmeraldas presentan 174 pares de bases (Sáenz et al., 2015). Estos parásitos corresponden al linaje clonal E descrito por Griffing et al., 2011. Este linaje clonal también se observa en el aislado Ecu 1110, una muestra aislada en Ecuador en 1990 lo que sugiere que el linaje clonal E puede ser originario de Ecuador o Colombia (Sáenz et al., 2015) y que ha circulado en la región noroeste del Ecuador durante un período prolongado de tiempo y sigue haciéndolo en la actualidad, algo común en zonas de baja transmisión (Sáenz et al., 2015; Knudson et al., 2020).

Una muestra perteneciente a Tobar Donoso se encuentra en el grupo azul (Figura 6C), grupo que se observa también en Nariño Colombia en las muestras estudiadas por Murillo et al., (2015). El perfil de microsatélites de esta muestra podría ser similar al Linaje clonal F descrito por Dorado et al., (2016) no obstante, los microsatélites 2490 y C2M34 no presentaron resultados. Esto indica que el posible origen de este parásito puede ser Colombia o que el mismo ha recirculado en baja proporción en el país en los últimos años, ya que se pueden observar muestras de San Lorenzo entre 2013 y 2016 presentes en el grupo azul (Figura 6B).

El último grupo, el grupo rosado (Figura 6C) se encuentran tres muestras de Tobar Donoso, dos de la ciudad de Esmeraldas y dos de las muestras de origen colombiano en los años 2019 y 2020. El perfil de microsatélites de este grupo es similar al de muestras provenientes de Tobar Donoso y San Lorenzo analizadas por Vera-Arias et al., (2019). Esto indica que los parásitos de este grupo han recirculado en la zona noroeste del país desde años atrás.

La baja diversidad genética que se evidenció en los *P. falciparum* circulando la zona noroeste del país y la alta clonalidad que presentaron los mismos, son importantes para el programa de eliminación de la malaria, ya que facilita el desarrollo de métodos de control y eliminación, al ser todos los parásitos cercanos genéticamente es posible que un único tratamiento y método de control bien implementados sean suficientes para su eliminación. La baja diversidad y las bajas tasas de recombinación presentan el beneficio adicional de que es menos probable el surgimiento de resistencia a fármacos (Escalante et al., 2015). El hecho de que dos grupos genéticos presentes en el Ecuador provengan de Colombia indica que hay grupos genéticos movilizándose entre ambos países de manera constante. Además, se observó también dos grupos genéticos que ya se encontraban en el país años atrás, esto indica que los programas de control que han llevado a cabo ambos países por separado no han sido eficientes en el control de las poblaciones de *P. falciparum* circulando en la región fronteriza entre Ecuador y Colombia. Por esta razón, es de suma importancia que exista colaboración activa y sistemática en los programas de control por parte de ambos países, principalmente en la elaboración de estrategias de control y prevención de malaria, ya que esto ayudará a la eliminación de las infecciones producidas por este parásito en la zona fronteriza.

7. CONCLUSIONES

Los análisis realizados a las muestras de *Plasmodium falciparum* colectadas en los años 2019 y 2020 en las localidades de la ciudad de Esmeraldas, San Lorenzo y Tobar Donoso evidenciaron que la diversidad genética en la zona es baja.

Los análisis de estructura poblacional demostraron que existen dos grupos genéticos predominantes y dos grupos genéticos minoritarios de *P. falciparum* en el noroeste ecuatoriano en los años 2019 y 2020.

El bajo número de muestras colectadas en la localidad de San Lorenzo fue insuficiente para conocer con claridad la situación de los parásitos de *P. falciparum* en esa localidad.

La comparación de las muestras obtenidas en los años 2019 y 2020 con muestras obtenidas entre 2013 y 2016 en las mismas localidades demostró que, a excepción de un grupo genético, los grupos genéticos circulando en la actualidad son muy similares, aunque se observa una diferente proporción y ubicación geográfica de los mismos.

La comparación de las muestras obtenidas en los años 2019 y 2020 en Ecuador con muestras colectadas en Perú y Colombia en años pasados mostró que las muestras de los tres países comparten linajes genéticos, lo que sugiere que la migración en zonas fronterizas ha promovido el transporte de parásitos entre países, principalmente entre Ecuador y Colombia.

El brote ocurrido en la ciudad de Esmeraldas fue provocado por parásitos provenientes de Nariño (Colombia) que ingresaron al país por medio de la localidad fronteriza de San Lorenzo. Posiblemente, estos parásitos son originarios de Antioquia en el norte de Colombia, parásitos que han migrado hacia el sur por la costa colombiana hasta introducirse en el Ecuador desde Nariño

En la actualidad existen cuatro grupos genéticos en el Ecuador, dos grupos que muy probablemente provienen de Nariño en Colombia (grupos genéticos Ev1 y F), un grupo que se encuentra circulando en Ecuador desde hace décadas (grupo genético E) y parásitos producto de recombinación genética circulando en la zona fronteriza desde al menos el año 2015.

El bajo número de muestras procedentes de Colombia de infecciones producidas en la actualidad puede ser un factor limitante en cuanto a la relación de los parásitos ecuatorianos y los colombianos.

8. RECOMENDACIONES

Realizar muestreos con mayor regularidad para disponer de una mayor cantidad de datos, y así comprender de mejor manera la forma en la que interactúan y se relacionan los parásitos de *Plasmodium falciparum* en el Ecuador.

Realizar muestreos en un mayor número de localidades del país para obtener una visión más amplia y más acertada de la situación de *P. falciparum* en el país.

Comparar las muestras obtenidas en Ecuador con muestras procedentes de países vecinos de estudios recientes para evitar el sesgo que pueda producirse debido a los cambios genéticos ocurridos con el pasar de los años.

Tanto Ecuador como Colombia deberían trabajar en conjunto en programas de eliminación de la malaria, ya que como se observó ambos países comparten parásitos de forma regular gracias a la migración humana en la zona noroeste del país.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdallah, J. F., Okoth, S. A., Fontecha, G. A., Torres, R. E. M., Banegas, E. I., Matute, M. L., ... y Udhayakumar, V. (2015). Prevalence of pfhrp2 and pfhrp3 gene deletions in Puerto Lempira, Honduras. *Malaria journal*, *14*(1), 19.

Akinyi, S., Hayden, T., Gamboa, D., Torres, K., Bendezu, J., Abdallah, J. F., ... y Lucas, C. (2013). Multiple genetic origins of histidine-rich protein 2 gene deletion in Plasmodium falciparum parasites from Peru. *Scientific reports*, *3*, 2797.

Amoah, L. E., Abankwa, J., y Oppong, A. (2016). Plasmodium falciparum histidine rich protein-2 diversity and the implications for PfHRP 2: based malaria rapid diagnostic tests in Ghana. *Malaria journal*, *15*(1), 101.

Anderson, T. J. C., SU, X. Z., Bockarie, M., Lagog, M., y Day, K. P. (1999). Twelve microsatellite markers for characterization of Plasmodium falciparum from finger-prick blood samples. *Parasitology*, *119*(2), 113-125.

Anderson, T. J., Haubold, B., Williams, J. T., Estrada-Franco §, J. G., Richardson, L., Mollinedo, R., ... y Whitworth, J. (2000). Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Molecular biology and evolution*, *17*(10), 1467-1482.

Applied Biosystems. (2006). *Peak Scanner Software Version 1.0. Reference Guide.*

Arévalo-Herrera, M., Quiñones, M. L., Guerra, C., Céspedes, N., Girón, S., Ahumada, M., ... y Padilla, J. C. (2012). Malaria in selected non-Amazonian countries of Latin America. *Acta tropica*, *121*(3), 303-314.

Avise, J. 2012. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman y Hall book.

Baldeviano, C., Okoth, S., Arrospide, N., González, R., Sánchez, J., Macedo, S., Conde, S., Tapia, L., Salas, C., Gamboa, D., Herrera, Y., Edgel, K., Udhayakumar, V., y Lescano, A. (2015). Molecular Epidemiology of Plasmodium falciparum Malaria Outbreak, Tumbes, Peru, 2010–2012. *Emerging infectious diseases*, 21(5), 797.

Bousema, T., y Drakeley, C. (2011). Epidemiology and infectivity of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax gametocytes in relation to malaria control and elimination. *Clinical microbiology reviews*, *24*(2), 377-410.

Branch, O. H., Sutton, P. L., Barnes, C., Castro, J. C., Hussin, J., Awadalla, P., y Hijar, G. (2011). Plasmodium falciparum genetic diversity maintained and amplified over 5 years of a low transmission endemic in the Peruvian Amazon. *Molecular biology and evolution*, *28*(7), 1973-1986.

Campos, I. M., Uribe, M. L., Cuesta, C., Franco-Gallego, A., Carmona-Fonseca, J., y Maestre, A. (2011). Diagnosis of gestational, congenital, and placental malaria in Colombia: comparison of the efficacy of microscopy, nested polymerase chain reaction, and histopathology. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, *84*(6), 929-935.

Canier, L., Khim, N., Kim, S., Sluydts, V., Heng, S., Dourng, D., ... y Ken, M. (2013). An innovative tool for moving malaria PCR detection of parasite reservoir into the field. *Malaria journal*, *12*(1), 405.

Centros para el control y la Prevención de Enfermedades (2015a). *Malaria*. Recuperado de https://www.cdc.gov/malaria/about/%5bes-es%5dfaqs.html

Centros para el control y la Prevención de Enfermedades (2015b). *Malaria*. *Disease.* Recuperado de https://www.cdc.gov/malaria/about/disease.html

Centros para el control y la Prevención de Enfermedades (2018a). *Malaria*. *Biology*. Recuperado de https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html

Centros para el control y la Prevención de Enfermedades (2018b). *Malaria*. *Mosquitoes*. Recuperado de https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html#tabs-1-5

Centros para el control y la Prevención de Enfermedades (2019a). *Malaria*. *Causal* Agent. Recuperado de https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html

Centros para el control y la Prevención de Enfermedades (2019b). *Malaria*. *Disease*. Recuperado de https://www.cdc.gov/malaria/about/disease.html

Chenet, S. M., Akinyi Okoth, S., Huber, C. S., Chandrabose, J., Lucchi, N. W., Talundzic, E., ... y Venkatesan, M. (2016). Independent emergence of the

Plasmodium falciparum kelch propeller domain mutant allele C580Y in Guyana. *The journal of infectious diseases*, *213*(9), 1472-1475.

Curtis, H., Bahrens, V., Schnek, A., Massarini, A. (2008). *Biología* (7ª ed.). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.

Dondorp, A. M., Nosten, F., Yi, P., Das, D., Phyo, A. P., Tarning, J., ... y Ringwald, P. (2009). Artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria. *New England Journal of Medicine*, *361*(5), 455-467.

Dorado, E. J., Okoth, S. A., Montenegro, L. M., Diaz, G., Barnwell, J. W., Udhayakumar, V., y Murillo Solano, C. (2016). Genetic characterisation of Plasmodium falciparum isolates with deletion of the pfhrp2 and/or pfhrp3 genes in Colombia: the Amazon region, a challenge for malaria diagnosis and control. *PLoS One*, *11*(9), e0163137.

Echeverry, D. F., Nair, S., Osorio, L., Menon, S., Murillo, C., y Anderson, T. J. (2013). Long term persistence of clonal malaria parasite Plasmodium falciparum lineages in the Colombian Pacific region. *BMC genetics*, *14*(1), 1-13.

Ellegren, H. (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature reviews genetics*, *5*(6), 435-445.

Enomoto, M., Kawazu, S. I., Kawai, S., Furuyama, W., Ikegami, T., Watanabe, J. I., y Mikoshiba, K. (2012). Blockage of spontaneous Ca2+ oscillation causes cell death in intraerythrocitic Plasmodium falciparum. *PloS one*, *7*(7).

Escalante, A. A., Ferreira, M. U., Vinetz, J. M., Volkman, S. K., Cui, L., Gamboa, D., ... y Felger, I. (2015). Malaria molecular epidemiology: lessons from the International Centers of Excellence for Malaria Research Network. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, *93*(3_Suppl), 79-86.

Fairhurst, R. M., Nayyar, G. M., Breman, J. G., Hallett, R., Vennerstrom, J. L., Duong, S., ... y Dondorp, A. M. (2012). Artemisinin-resistant malaria: research challenges, opportunities, and public health implications. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, *87*(2), 231-241.

Gardner, M. J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R. W., ... y Paulsen, I. T. (2002). Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Nature*, *419*(6906), 498-511.

Gosling, R., y von Seidlein, L. (2016). The future of the RTS, S/AS01 malaria vaccine: an alternative development plan. *PLoS medicine*, *13*(4), e1001994.

Griffing, S. M., Mixson-Hayden, T., Sridaran, S., Alam, M. T., McCollum, A. M., Cabezas, C., ... y Arrospide, N. (2011). South American Plasmodium falciparum after the malaria eradication era: clonal population expansion and survival of the fittest hybrids. *PloS one*, *6*(9), e23486.

Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Chaumeil, P., Léger, P., Lepais, O., ... y Petit, R. J. (2011). Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular ecology resources*, *11*(4), 591-611.

Hiwat, H., Issaly, J., Gaborit, P., Somai, A., Samjhawan, A., Sardjoe, P., ... y Girod, R. (2010). Behavioral heterogeneity of Anopheles darlingi (Diptera: Culicidae) and malaria transmission dynamics along the Maroni River, Suriname, French Guiana. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *104*(3), 207-213.

ISGlobal (2018). *Preguntas frecuentes sobre la vacuna RTS,S contra la malaria.* Recuperado de https://www.isglobal.org/documents/10179/25254/q%26a_rtss_cast.pdf/85534db2-be16-46f1-af72-cfd7a53faf43

Knudson, A., González-Casabianca, F., Feged-Rivadeneira, A., Pedreros, M. F., Aponte, S., Olaya, A., ... y Salazar-Terreros, M. J. (2020). Spatio-temporal dynamics of Plasmodium falciparum transmission within a spatial unit on the Colombian Pacific Coast. *Scientific reports*, *10*(1), 1-16.

Mahende, C., Ngasala, B., Lusingu, J., Yong, T. S., Lushino, P., Lemnge, M., ... y Premji, Z. (2016). Performance of rapid diagnostic test, blood-film microscopy and PCR for the diagnosis of malaria infection among febrile children from Korogwe District, Tanzania. *Malaria journal*, *15*(1), 391.

Ministerio de Salud Pública del Ecuador (2018). *Gaceta Epidemiológica de Enfermedades Transmitidas por Vectores, Malaria SE-52.* Recuperado de https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/01/GACETA-VECTORES-SE-52.pdf

Ministerio de Salud Pública del Ecuador (2019). *Gaceta Epidemiológica de Enfermedades Transmitidas por Vectores, Malaria SE-52.* Recuperado de

https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2020/02/GACETA-VECTORES-SE-52.pdf

Ministerio de Salud Pública del Ecuador (2019b). *Diagnóstico y tratamiento de la malaria. Protocolo.* Recuperado de https://aplicaciones.msp.gob.ec/salud/archivosdigitales/documentosDirecciones/dnn/archivos/AC_0346_2019%2029%20ABRIL.pdf

Molina, A. (2015). La odisea del parásito de la malaria, *Plasmodium falciparum*, adaptándose a mosquitos del nuevo mundo. Revista de la Universidad de Guatemala, 30.

Murillo Solano, C., Akinyi Okoth, S., Abdallah, J. F., Pava, Z., Dorado, E., Incardona, S., ... y Barnwell, J. W. (2015). Deletion of Plasmodium falciparum histidine-rich protein 2 (pfhrp2) and histidine-rich protein 3 (pfhrp3) genes in Colombian parasites. *PloS one*, *10*(7), e0131576.

National Human Genome Research Institute (s.f.). *Polimorfismo*. Recuperado de https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Polimorfismo

Obaldia III, N., Baro, N. K., Calzada, J. E., Santamaria, A. M., Daniels, R., Wong, W., ... y Wirth, D. F. (2015). Clonal outbreak of Plasmodium falciparum infection in eastern Panama. *The Journal of infectious diseases*, *211*(7), 1087-1096.

Oehring, S. C., Woodcroft, B. J., Moes, S., Wetzel, J., Dietz, O., Pulfer, A., ... y Brancucci, N. M. (2012). Organellar proteomics reveals hundreds of novel nuclear proteins in the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Genome biology*, *13*(11), R108.

Oliva, R., Ballesta, F., Oriola, J., Clària, J. 2004. Genética médica. Universidad de Barcelona.

Organización mundial de la Salud (2018). *Paludismo. Datos y Cifras*. Recuperado de https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/malaria

Orjuela-Sánchez, P., Brandi, M. C., y Ferreira, M. U. (2013). Microsatellite analysis of malaria parasites. In *Microsatellites* (pp. 247-258). Humana Press, Totowa, NJ.

Pan American Health Organization/ World Health Organization (2018). *Aumentan los casos de malaria en las Américas*. Recuperado de https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=14080:aumentan-los-casos-de-malaria-en-las-americas&Itemid=1926&lang=es#:~:text=Aumentan%20los%20casos%20de%20malaria%20en%20las%20Am%C3%A9ricas,seguimiento%20para%20controlar%20la%20enfermedad.

Pritchard, J., Wen, X., Falush, D. 2010. *Documentation for structure software: Version 2.3.4.*

Reece, A., Hobbins, J. (2010). *Obstetricia Clínica (3ª er.)*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.

Sáenz, F. E., Arévalo-Cortés, A., Valenzuela, G., Vallejo, A. F., Castellanos, A., Poveda-Loayza, A. C., ... y Castro, L. E. (2017). Malaria epidemiology in low-endemicity areas of the northern coast of Ecuador: high prevalence of asymptomatic infections. *Malaria journal*, *16*(1), 300.

Sáenz, F. E., Morton, L. C., Okoth, S. A., Valenzuela, G., Vera-Arias, C. A., Vélez-Álvarez, E., ... y Udhayakumar, V. (2015). Clonal population expansion in an outbreak of Plasmodium falciparum on the northwest coast of Ecuador. *Malaria journal*, *14*(1), 497.

Swiss Institute of Bioinformatics. (2015). *Arlequin version 3.5.2.2.: An integrated software package for population genetics data analysis. User Manual.*

Thera, M. A., y Plowe, C. V. (2012). Vaccines for malaria: how close are we?. *Annual review of medicine*, *63*, 345-357.

Torrús, D., Carranza, C., Ramos, J. M., Rodríguez, J. C., Rubio, J. M., Subirats, M., y Ta-Tang, T. H. (2015). Diagnóstico microbiológico de la malaria importada. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *33*, 40-46.

Valenzuela Sánchez, G. P. (2013). *Genotipos de diversidad genética y resistencia a antimaláricos en Plasmodium ecuatorianos* (Tesis de licenciatura).

Vera-Arias, C. A., Castro, L. E., Gómez-Obando, J., y Sáenz, F. E. (2019). Diverse origin of Plasmodium falciparum in northwest Ecuador. *Malaria journal*, *18*(1), 251.

World Health Organization (2015). *Guidelines for the treatment of malaria (3h ed).* Geneva, Switerland: World Health Organization.

World Health Organization (2020a). *Malaria. Key facts*. Recuperado de https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria

World Health Organization (2020b). *World Malaria Report 2019*. Geneva, Switerland: World Health Organization.

World Health Organization (2020c). *Malaria. Q&A on the malaria vaccine implementation programme (MVIP)*. Recuperado de https://www.who.int/malaria/media/malaria-vaccine-implementation-qa/en/

Yalcindag, E., Elguero, E., Arnathau, C., Durand, P., Akiana, J., Anderson, T. J., ... y Carnevale, P. (2012). Multiple independent introductions of Plasmodium falciparum in South America. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(2), 511-516.

Zoghi, S., Mehrizi, A. A., Raeisi, A., Haghdoost, A. A., Turki, H., Safari, R., ... y Zakeri, S. (2012). Survey for asymptomatic malaria cases in low transmission settings of Iran under elimination programme. *Malaria Journal*, *11*(1), 126.

10. ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento informado que se utilizó para la toma de las muestras de sangre.

Formulario de Consentimiento Informado.
CLÍNICA. Información para el paciente sano y el paciente con enfermedad activa

Responsable: Dr. Fabián Sáenz

Organización: Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Investigación sobre la malaria en Ecuador

Introducción: El Centro de Investigación para la Salud en América Latina (CISeAL) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE) se encuentra realizando trabajos de investigación sobre la malaria en el Ecuador y deseamos invitarle a participar en esta investigación. Antes de decidir participar o no, usted puede consultar con alguien más sobre su participación. Vamos a leer este documento que tiene los detalles sobre la investigación, sin embargo, si hay alguna palabra que no entienda, por favor, infórmenos para poder explicarle. Usted puede realizar preguntas en cualquier momento.

Propósito del proyecto: La malaria es una enfermedad que afecta a mucha gente en Ecuador. Este proyecto de investigación quiere saber si hay esta enfermedad en su comunidad y por qué. Pedimos su ayuda voluntaria. Su participación ayudará a obtener información valiosa que ayudará a diseñar maneras de controlar y prevenir esta enfermedad.

Tipo de Intervención: Esta investigación incluirá responder una encuesta con información general sobre conocimientos de la enfermedad que durará entre 5-10 minutos y la toma de sangre del dedo o de la vena.

Selección de participantes: En esta investigación podrán participar personas mayores de dos años que residan en la comunidad y que demuestren disposición de participar (voluntarios) al firmar este documento.

Participación voluntaria: Usted puede elegir libremente participar o no participar en absoluto en este proyecto de investigación. Si usted no desea participar o se retira del estudio no habrá ninguna consecuencia y no perderá ninguno de los beneficios de atención de salud que existen normalmente. Para que usted pueda participar en este proyecto, es necesario que usted entienda lo que se vamos a necesitar. Si acepta colaborar voluntariamente con nosotros, debe firmar (o poner su huella digital) en la línea disponible abajo en este formulario.

Usted puede dejar de participar en este proyecto en cualquier momento sin necesidad de dar ninguna explicación. De igual manera, los investigadores pueden terminar su participación en el mismo. Si éste es el caso, usted será notificado. No hay costo por participar en esta investigación. Si usted tiene dudas sobre la investigación o sobre sus derechos en este proyecto de investigación, por favor pregunte al entrevistador o contacte a las personas nombradas abajo.

Procedimientos: Un encuestador le pedirá que responda ciertas preguntas sobre su conocimiento de malaria. Además, personal entrenado tomará muestras de sangre. La muestra de sangre se tomará una sola vez usando una jeringa para obtener entre 4 y 5 ml de sangre (entre 1 y 2 cucharaditas) o mediante un pinchazo en el dedo, con una lanceta, para obtener 10 gotas de sangre. Estas muestras serán examinadas por los médicos, de encontrarse que usted requiere tratamiento médico, será referido a las unidades del Ministerio de Salud. En caso de que usted tenga malaria se le solicitará otra muestra a futuro si usted está de acuerdo.

Investigación: La investigación utilizará parte de la información clínica como presencia de síntomas, edad, sexo y lugar posible de infección, así como las muestras de sangre sin que estos tengan referencia a su nombre. A sus muestras e información privada se le asignará un código. Esta información será utilizada para estudiar las enfermedades en su comunidad, la respuesta a medicamentos y cómo éstas se relacionan con los factores de riesgo a los cuales usted puede estar expuesto. Usted no será identificado por nombre en ningún informe publicado ni en presentaciones de los resultados. Las muestras, sin conexión con su nombre serán almacenadas en refrigeración o congelación. Las muestras no serán utilizadas a futuro con otra finalidad no especificada, serán descartadas después del uso específico en este proyecto. No se utilizará un consentimiento informado amplio.

Confidencialidad: Toda la información que usted proporcione será mantenida confidencialmente y utilizada solamente para propósitos de la investigación sin conexión a su nombre. Los resultados generales, serán compartidos con el Ministerio de Salud Pública del Ecuador y su comunidad.

Riesgos: Los riesgos potenciales asociados a su participación son las molestias al sacar la sangre. La toma de muestras de sangre será realizada por profesionales debidamente entrenados, utilizando agujas y lancetas nuevas, siguiendo normas internacionales, lo que reducirá la posibilidad de molestias por la toma de sangre.

Beneficios: Los beneficios potenciales de su participación incluyen tratamiento contra la malaria (en caso de ser diagnosticado con la enfermedad usted será derivado a un establecimiento del MSP), un incremento en el conocimiento sobre la prevención de enfermedades tropicales y la futura implementación de estrategias de control e intervención, que tienen el potencial de mejorar la salud de su comunidad.

Compensaciones: No existe compensación financiera por su participación en el estudio.

Declaración general de consentimiento: "Al firmar (o poner mi huella digital) abajo, declaro que los investigadores a cargo de este proyecto me han explicado los propósitos y los beneficios y riesgos de la investigación, y que los he entendido plenamente. Entiendo claramente que no hay compensación monetaria por mi participación de parte de la PUCE, ni de las otras instituciones implicadas, y/o de sus empleados, y que en caso de alguna lesión que pudiese sufrir por mi participación en esta investigación, se buscarán las prestaciones médicas necesarias sin costo para mí a través de las unidades del Ministerio de Salud". Al firmar (o poner mi huella digital) abajo declaro que entiendo el alcance y los objetivos del Proyecto, y estoy dispuesto a participar voluntariamente".

Nombre del participante:

Firma (o huella digital) del participante o su representante legal._____ Fecha: _____ de ___ del 201_

He leído con exactitud o he sido testigo de la lectura exacta del documento de consentimiento informado para el potencial participante y el individuo ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Confirmo que el individuo ha dado consentimiento libremente.
Nombre del testigo:

Firma del testigo (en caso de analfabetismo) _____ Fecha: _____ de _____ del 201_

Nombre del investigador/asistente:

Firma del investigador/asistente: _____ Fecha: _____ de _____ del 201_

Ha sido proporcionado, al participante, una copia de este documento _____ _(iniciales del investigador/asistente)
Personas a contactar: Esta propuesta ha sido revisada y aprobada por el Comité de Ética de la PUCE, que es un comité cuya tarea es asegurarse de que se protege de daños a los participantes en la investigación. Si usted tiene preguntas sobre esta investigación por favor comuníquese con el Dr. Fabián Sáenz, CISeAL, PUCE. Ave. 12 de Octubre 1076 y Roca. Tel. (02) 299 1700 ext. 2272 ó 2271. Fax. (02) 299 1689 Email: fsaenz213@puce.edu.ec.

Si tiene preguntas sobre sus derechos como participante en esta investigación comuníquese con el **Dr. Hugo Guillermo Navarrete Zambrano ,** Secretario del Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. **Dirección de Investigación y Postgrados,** Av. 12 de Octubre 1076 y Roca (Quito, Ecuador), Teléfonos: 299 1533, CEISH-PUCE: 299 1700 ext. 2917.

Anexo 2. Asentimiento informado que se utilizó para la toma de muestras de sangre en caso de que la persona infectada sea menor de edad.

Asentimiento del menor para participar en la investigación

Título de la investigación: Determinación del origen de infecciones de malaria en comunidades de la Provincia de Esmeraldas, Cantones Muisne, Esmeraldas y San Lorenzo, durante el periodo 2018-2019.

Responsable: Dr. Fabián Sáenz

Organización: Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Investigación sobre la malaria en Ecuador

Objetivo del estudio: La malaria es una enfermedad peligrosa que afecta a mucha gente en Ecuador. Este proyecto quiere saber si hay esta enfermedad en tu comunidad y por qué.

Tu participación en el estudio consistirá en contestar unas preguntas acerca de cómo te sientes y en permitirnos obtener una pequeña muestra de sangre de tu brazo o dedo. El procedimiento no es peligroso y tal vez solo te moleste un poco.

Tu participación en el estudio es voluntaria, es decir que aun cuando tu papá o tu mamá hayan dicho que puedes participar, si tu no quieres hacerlo puedes decir que no. Es tu decisión si participas o no en el estudio. También es importante que sepas que si en un momento dado ya no quieres continuar en el estudio, no habrá ningún problema, o si no quieres responder a alguna pregunta en particular, tampoco habrá problema.

Toda la información que nos proporciones nos ayudará a entender mejor la situación de la malaria en tu comunidad para prevenirla a futuro.

Esta información será confidencial. Eso quiere decir que no diremos a nadie tus respuestas, solo lo sabrán las personas que forman parte del equipo de este estudio.

Mi nombre es _____ y estoy de acuerdo con participar en esta investigación. Me han explicado el proyecto, entiendo y me siento cómodo respecto al tema y las actividades del proyecto. Tengo el permiso de mis padres/tutores para participar en él. También entiendo mis derechos y sé que tengo la plena libertad para retirarme de este proyecto y no responder a alguna pregunta o ser parte de alguna actividad si no quiero. Entiendo que no seré penalizado por no participar.

Entiendo que si tengo preguntas sobre el trato o cualquier otro asunto relacionado a mi participación, puedo contactarme con el Dr. Fabián Sáenz, CISeAL, PUCE. Ave. 12 de octubre 1076 y Roca. Tel. (02) 299 1700 ext. 2272 ó 2271. Fax. (02) 299 1689 Email: fsaenz213@puce.edu.ec o con el **Dr. Hugo Navarrete Zambrano,** Secretario del Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. **Dirección de Investigación y Postgrados,** Av. 12 de Octubre 1076 y Roca (Quito, Ecuador), Teléfonos: 299 1533, 299 1700 ext. 2917.

Nombre del representante legal del menor
_____

Firma del representante legal del
menor_____

Firma o huella digital del menor
_____

Nombre_____
_____

Fecha
_____
_____

Información del menor:

Nombre: _____

Fecha de nacimiento: _____Edad: _____