

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

CENTRO REGIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA ESCUELA DE SALUD PÚBLICA DE MÉXICO

TESIS

**Diversidad genética y antigénica de moléculas candidatos para vacunas (*dbp_{II}*,
ama1_{I-II} y *msp1₄₂*) del merozoíto de *Plasmodium vivax* del sur de México**

Requisito parcial para optar al grado de:
Maestro en Ciencias de la Salud con Área de Concentración en
Enfermedades Transmitidas por Vector

Presenta:

Med. Jordán Corzo Mancilla

Directora de Tesis:

Dra. Lilia González Cerón

Asesores:

Dr. René Cerritos Flores

Dra. María del Carmen Rodríguez Gutiérrez

Este trabajo se realizó en el laboratorio de inmunoparasitología molecular del Centro de Regional de Investigación en Salud Pública, con recursos financieros de los proyectos de CONACyT-México: Salud-2004-01-119 and CB-2009-01-131247 bajo responsabilidad de la Dra. Lilia González Cerón.

**Diversidad genética y antigénica de moléculas candidatos para vacunas
(*dbpII*, *ama1I-II* y *msp1₄₂*) del merozoíto de *Plasmodium vivax* del Sur de
México**

Artículo sometido de acuerdo a los requerimientos del Instituto Nacional de Salud
Pública para obtener el grado de Maestro en Ciencias de la salud con área de
concentración en Enfermedades Transmitidas por vector

Por:

Med. Jordán Corzo Mancilla

Septiembre, 2013

DEDICATORIA

He aquí, Tu amas la verdad en lo íntimo, y en lo secreto me has hecho comprender la sabiduría.

Salmo 51:6

A

Blanca Dina Ruiz Gómez “Mami Ruiz” †

Mis hijas Cristi y Gaby, por ser la extensión de mi vida

Mis padres Jordán y Gabriela

Mis hermanas y su familia

AGRADECIMIENTOS:

A la Dra. Lilia González Cerón, por compartir sus conocimientos y experiencia para la culminación de esta Tesis, por la confianza y apoyo brindado.

A mis Asesores al Dr. Rene Cerritos Flores y la Dra. María del Carmen Rodríguez Gutiérrez, por sus valiosas aportaciones. En especial al Dr. Rene por compartir sus conocimientos y su apoyo durante el desarrollo de la tesis.

A la QFB. Frida Santillán Valenzuela, QFB. Marco Alesio Sandoval Bautista y personal de laboratorio por el apoyo técnico, compartir sus experiencias y amistad.

Al Dr. Ciro Montero Solís, por su apoyo.

A amigos y compañeros del Posgrado: Josselin Corzo, Belem Puerto, David Moo, Angélica Pech, Amaia Izeta, Carlos Mazariegos, Sury Antonio López, por su compañía y apoyo.

A la Secretaría de Salud del Estado de Chiapas, por el todo el apoyo brindado.

CONTENIDO

Página

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
MATERIALES Y MÉTODOS	6
Origen de la muestra y extracción de ADN.....	6
Amplificación de los segmentos <i>dbp_{II}</i> , <i>ama1_{I-II}</i> y <i>mSP1₄₂</i> con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	6
Purificación y secuenciación.....	7
Análisis de datos.....	7
Diversidad genética.....	8
Selección natural.....	8
Diferenciación genética.....	8
Polimorfismo antigénico en <i>DBP_{II}</i> , <i>MSP1₄₂</i> y <i>AMA1_{I-II}</i> ...	8
RESULTADOS	10
Polimorfismo genético.....	10
Diversidad genética.....	13
Selección natural y recombinación.....	14
Diferenciación genética.....	16
Distribución temporal de los haplotipos para <i>dbp_{II}</i> , <i>ama1_{I-II}</i> y <i>mSP1₄₂</i>	17
Polimorfismo antigénico.....	17
DISCUSIÓN	20
BIBLIOGRAFÍA	25
ANEXOS	31

RESUMEN

Antecedentes. *Plasmodium vivax* es la especie del género *Plasmodium* más distribuida en el mundo y por sus características biológicas representa un reto para avanzar a la eliminación de la transmisión del paludismo. Los genes que son polimórficos y codifican para candidatos de vacunas proveen información sobre las poblaciones que circulan y las variantes antigénicas. En este trabajo se estudiaron los genes que codifican para proteínas de superficie del merozoíto que participan en la invasión al eritrocito y se analizó su diversidad, diferenciación genética y su impacto sobre el polimorfismo antigénico de *P. vivax*.

Método. Se obtuvieron muestras de sangre infectadas con *P. vivax* de pacientes en el Sur de México durante los años 2006 y 2007. Se extrajo el ADN genómico y se utilizó para amplificar por PCR los segmentos de genes *dbpII* (1,104pb), *ama-1I-II* (885pb) and *msp1₄₂* (1,072pb) que codifican para la proteína de unión a Duffy, el antígeno apical de membrana y la proteína de superficie del merozoíto 1, respectivamente. Los productos de PCR se purificaron y secuenciaron por el método de Sanger. Las secuencias de nucleótidos de cada gen se alinearon con secuencias de los mismos genes de parásitos de otras regiones geográficas disponibles en el Gen Bank. Se determinaron los índices de diversidad genética, índice de diferenciación (*Fst*), selección natural (dS/dN) y pruebas para recombinación utilizando los programas DnaSPv5 y MEGA5.0. En la secuencia traducida a aminoácidos se analizaron los posibles polimorfismos antigénicos.

Resultados: La diversidad genética de los parásitos del Sur de México para *dbpII*, *ama-1I-II* y *msp1₄₂* fue menor comparada con la mayoría de los otros sitios geográficos analizados, para *dbpII* (n=35; $\pi=0.004$; $\theta=0.0036$; H=7; HD=0.5531; una mutación sinónima (S) y 12 no sinónimas (SN)) < *ama-1I-II* (n=34; $\pi=0.008$; $\theta=0.004$; H=7; HD=0.709; 2 S y 17 NS) < *msp1₄₂* (n=34; $\pi=0.018$; $\theta=0.0122$; H=8; HD=0.787; 6 S y 50 NS), con dos, cinco y seis haplotipos exclusivos para el Sur de México, respectivamente. En todos los genes se encontró eventos de recombinación y selección natural de tipo positiva como los principales mecanismos de generación y mantenimiento de diversidad genética, respectivamente. Los índices de *Fst* fueron consistentemente altos entre los parásitos de México y de otras regiones geográficas, no se encontró asociación con la distancia geográfica, para *dbpII* el *Fst*

para parásitos de México y Colombia fue de 0.315 y Brasil de 0.2308; para *ama-1_{I-II}*, México y Venezuela el índice fue mayor (0.195) que con India (0.109) por el contrario para *msp1₄₂*, parásito de México y Corea del Sur (0.279) mostraron un índice mayor que los de Brasil (0.0989) e India (0.0697). Para DBP_{II} se encontró que la mayoría de los haplotipos contienen variantes antigénicas para anticuerpos neutralizantes. De los 16 haplotipos para *dbp_{II}-ama-1_{I-II}-msp1₄₂*, un haplotipo (A) se presentó en el 59% de las muestras del 2007, pero no fue detectado en el 2006 ($p=0.00024$).

Conclusiones: Los genes *dbp_{II}*, *ama-1_{I-II}* y *msp1₄₂* de *P. vivax* en el Sur de México mostraron una importante diversidad genética exhibiendo múltiples haplotipos nuevos, además exponen una población única y diferente de otras regiones geográficas. La frecuencia y fluctuación temporal de algunos haplotipos sugiere una dispersión parasitaria reciente de genotipos específicos tal vez influenciada por la presión de la respuesta inmune del hospedero vertebrado y por las medidas de control utilizadas en la región. Esta información será de gran utilidad para la vigilancia epidemiológica molecular y el desarrollo de vacunas.

PALABRAS CLAVE: *Plasmodium vivax*, aislados, merozoíto, proteína de superficie, proteína de superficie del merozoíto 1 (MSP1), antígeno apical de membrana (AMA1), proteína de unión al antígeno Duffy (DBP), diversidad genética, diferenciación genética (*Fst*), haplotipo, nucleótido, aminoácido, epítomos, gen *dbp_{II}*, gen *ama-1_{I-II}*, gen *msp1₄₂*

INTRODUCCIÓN.

Plasmodium vivax es la principal especie de *Plasmodium* causante del paludismo en el Medio Este, Asia, El Pacífico Oeste, América Central y del Sur donde viven alrededor de 2.85 billones de personas en riesgo de enfermar (Mendis *et al.*, 2001, Guerra *et al.*, 2010). Se estima que anualmente se producen 80 a 300 millones de casos (Arévalo *et al.*, 2010). Para el continente Americano, en el 2008, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) reportó 560,298 casos de paludismo, el 76.75% de estos fueron causados por *P. vivax* (PAHO, 2011; WHO, 2012). La enfermedad por *P. vivax* en comparación con *P. falciparum* es considerada menos grave o benigna y auto limitada, aunque hay evidencia de casos graves y fatales por *P. vivax* (Price *et al.*, 2007, Alexandre *et al.*, 2010), lo anterior sumado a la reemergencia de esta enfermedad en zonas geográficas en donde había sido eliminada, así como el aumento a la resistencia a los fármacos son elementos a considerar sobre todo en las regiones en donde el paludismo se encuentra en proceso de eliminación (Rodríguez *et al.*, 2011;WHO, 2012). En México los casos de paludismo han disminuido considerablemente comparando los quinquenios 2004-2008 con 2003-1999 con una reducción de casos de 35,981 a 14,786 actualmente, la transmisión está limitada a estados del Sur de México y focos aislados en el Centro y Noreste del país (<http://www.dgepi.salud.gob.mx>).

Como parte de las medidas de control dirigidas hacia la eliminación de la transmisión del paludismo es necesario conocer las características genético-biológicas de los parásitos, la enfermedad que producen y la dinámica de la transmisión. Los merozoítos de *P. vivax* invaden a los reticulocitos por una serie de procesos complejos de interacción de ligandos del parásito y receptores del hospedero; las principales fases son: I.- Unión inicial del merozoíto, II.- Reorientación, deformación del eritrocito y formación de unión estrecha merozoíto-eritrocito y III.- Entrada del parásito y formación de la vacuola parasitófora (Iyer *et al.*, 2007). La proteína de superficie del merozoíto 1 (MSP1) y el antígeno apical de membrana (AMA1) están implicados en la adhesión inicial al eritrocito y en la reorientación del merozoíto, respectivamente (Holder *et al.*, 1999, Pizarro *et al.*, 2005), mientras que la proteína de unión al antígeno Duffy (DBP) participa en la formación de la unión estrecha e irreversible con los receptores del eritrocito (Tsuboi *et al.*, 1994). Estas proteínas tienen características genéticas diferenciales que a continuación se indican.

- a) El gen de la proteína MSP1 se encuentra en el cromosoma siete y está dividido en varios bloques variables y rodeados de bloques conservados, codifica una proteína de 200 kDa que se expresa en la superficie del merozoíto, es sintetizada como un precursor de alto peso molecular y después procesada en fragmentos más pequeños 83, 30, 38 y 42kDa (Putaporntip *et al.*, 2002). En el momento de la invasión el fragmento C-terminal de 42kD se procesa en los fragmentos de 33 y 19 kDa (MSP1₃₃ y MSP1₁₉), este último induce anticuerpos bloqueadores y la región del gen que contiene este dominio (bloque 13) ha sido reportada altamente conservada (Bonilla *et al.*, 2006).
- b) El gen de la proteína AMA1 es una proteína secretada por el meronema, se encuentra en el cromosoma nueve, codifica para una proteína integral de membrana tipo 1 de 66 kDa conformada por al menos 16 residuos de cisteínas incorporadas dentro de ocho puentes disulfuro, está conformada por una región ectoplasmática, una región simple transmembranal y una pequeña región citoplasmática. La región ectoplasmática está formada por tres dominios: I, II y III, siendo el dominio I el más variable (Gunasakera *et al.*, 2007). La estructura de cristal de esta molécula mostró que los dominios I y II tienen una estructura similar al motivo PAN de adhesión por lo que este podría ser el sitio de interacción con el reticulocito (Pizarro *et al.*, 2005).
- c) El gen de la proteína DBP se encuentra en el cromosoma seis, codifica una proteína integral de membrana tipo 1 de 140 kDa y en su estructura contiene siete dominios bien definidos: el péptido señal, dos dominios ricos en cisteínas adyacentes amino N-cys y carboxilo C-cys (II y VI), tres dominios hidrófobicos (III - VI) y un dominio transmembranal (VII) (Vanbuskirk *et al.*, 2004). El dominio II (DBP_{II}) consta de 170 aminoácidos comprendidos entre las cisteínas 4 y 7 (entre los residuos 291 – 460), ha sido identificado como la principal región de adhesión específicamente con el Antígeno Duffy (AD) del reticulocito y en éste se presenta el 93% del polimorfismo de la molécula (Barnwell *et al.*, 1989; Ranjan y Chitnis *et al.*, 1999; Souza *et al.*, 2010), aunque el sitio preciso de la interacción parece ser muy conservado (VanBusKirk *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2006).

Las proteínas DBP (Grimberg *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007), AMA1 (Mufalo *et al.*, 2008) y MSP1 (Zeyre *et al.*, 2008; Bastos *et al.*, 2007), inducen anticuerpos neutralizantes que inhiben la

interacción ligando receptor entre el parásito y el reticulocito y son capaces de bloquear la invasión del parásito, por esta razón son consideradas las principales candidatas para vacunas para abatir la enfermedad y/o patología que causa del paludismo.

Los estudios genéticos nos permiten a diseñar estrategias más sensibles para identificar los cambios en la transmisión de la enfermedad, proyectar como las variantes genéticas se mantienen y cambian su frecuencia, dispersan y persisten en las zonas afectadas. Con esto será posible mejorar las estrategias de vigilancia y para avanzar hacia la eliminación de la transmisión, así como contribuir en el desarrollo y evaluación de vacunas (Arnott *et al.*, 2012).

La diversidad genética de *P. vivax* se ha reportado para el gen *dbpII* de aislados de América (Sousa *et al.*, 2010; Ampudia *et al.*, 1996), Asia (Kho *et al.*, 2001; Gosi *et al.*, 2008; Babaeekho *et al.*, 2009, Premaratne *et al.*, 2011) y Oceanía (Cole-Tobian *et al.*, 2007). Para el gen *amaI_{I-II}* en parásitos de Venezuela (Ord *et al.*, 2008), Asia (Putaporntip *et al.*, 2009; Gunasekera *et al.*, 2007; Moon *et al.*, 2010). Para el gen *mSP1₄₂* en parásitos de Asia (Dias *et al.*, 2010; Thakur *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2012). Estos genes son sometidos a una presión selectiva positiva, reportándose un alto grado de sustituciones no sinónimas (Gunasekera *et al.*, 2007, Gosi *et al.*, 2008). Los mecanismos que generan diversidad son principalmente las mutaciones y eventos de recombinación, pero la magnitud de la selección y recombinación varía entre estos genes y las regiones geográficas (Sousa *et al.* 2011; Premaratne *et al.* 2011). Además, algunas de las variantes antigénicas de epítomos B afectan el bloqueo de invasión de merozoitos a reticulocitos (VanBuskirk *et al.*, 2004; Hans *et al.*, 2005; Pizarro *et al.*, 2005; Dias *et al.*, 2011).

En este trabajo se analizó la diversidad y diferenciación de las secuencias de genes que codifican para las proteínas del merozoíto *DPB_{II}*, *MSP1₄₂* y *AMA_{I-II}* que participan en la interacción entre el eritrocito y los parásitos de *P. vivax* de pacientes del Sur de México y su impacto en el polimorfismo antigénico. Para las comparaciones, se incluyeron secuencias nucleotídicas reportadas para parásitos de otras regiones del mundo.

MATERIALES Y METODOS

Origen de la muestra y extracción de DNA.

Este estudio fue aprobado por el comité de ética y de investigación del Instituto Nacional de Salud Pública de México (INSP). Las muestras fueron obtenidas de pacientes infectados con *P. vivax* que acudieron al área de diagnóstico de paludismo del Centro Regional de Investigación en Salud Pública (CRISP-INSP) en Tapachula Chiapas, México durante 2006 y 2007. Los individuos que participaron en el estudio aceptaron hacerlo mediante consentimiento informado. El diagnóstico de paludismo por *P. vivax* se realizó por examen microscópico de la gota gruesa teñida con solución de Giemsa al 20%. De cada individuo se obtuvieron 5ml de sangre venosa, el paquete globular se separó y almacenó a -70°C hasta su uso. El ADN genómico total se extrajo del paquete globular utilizando el Kit de extracción QIAamp1 DNA Blood (Quiagen, Valencia CA) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante; de 100µl de paquete globular se obtuvieron 200µl de ADN en suspensión.

Amplificación de los segmentos *dbpII*, *msh142* y *ama1I-II* con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las condiciones de las reacciones de amplificación por PCR se resumen en el cuadro 1. Los productos amplificados se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% adicionados de bromuro de etidio al 0.2µg/ml en cámara de electroforesis horizontal Midicell primo (Thermo EC330 New York, USA), se agregó al primer carril del gel marcador molecular (la escalera de 100pb) DNA ladder 0.5µl (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). La calidad y cantidad del producto amplificado se visualizó en equipo de fotodocumentación con transluminador UV (modelo LMS-20E Bio-Doc-it Upland CA 97017001) y las fotografías digitales se almacenaron para su revisión.

Cuadro 1. Los iniciadores y condiciones de amplificación de los genes del merozoíto de *P. vivax*; *dbpII*, *msp1₄₂* y *ama1_{I-II}*

Genes e iniciadores	Mezcla de reacción	Condiciones de temperatura**	Tamaño del producto de PCR
<i>dbpII</i> Forward: <i>dbpf</i> ; 5'-GATAAACTGGGGAGGAAAAAGAT-3' Reverse: <i>dbpr</i> ; 5'-CTTATCGGATTTGAATTGGTGGC-3'	Mix 1x (60mM de Tris-SO ₄ 18mM de sulfato de Amonio) 2mM de MgSO ₄ 50nM de dNTPs 0.4µM de cada iniciador 1U Platinum Taq*	ciclo inicial 94°C 3 min. 35 ciclos 94°C 40 seg. 58°C 40 seg. 72°C 90 seg. ciclo final 72°C 5 min	≈1.2 kb
<i>ama1_{I-II}</i> Forward: <i>ama1f</i> -5'-CCAGCTGGAAGATGTCCTG-3' Reverse: <i>ama1r</i> -5'-CCGCCCTTTTCTCTACACAG-3'	1U Platinum Taq*	ciclo inicial 95°C 5min. 35 ciclos 95°C 60 seg. 60°C 40 seg. 72°C 75 seg. ciclo final 72°C 10 min.	≈1.1 kb
<i>msp1₄₂</i> Forward: <i>Pvmsp1</i> -5'AAGCTTAGAGGACTACGACAAAG Reverse: <i>Pvmsp1</i> -3'-GGTCGAAGGATTCGAACGAGCTCG	1-4µl de ADN molde**	ciclo inicial 95°C 5min. 35 ciclos 95°C 60 seg. 62°C 40 seg. 72°C 75 seg. ciclo final 72°C 10 min.	≈1.2 kb

Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA. HighFidelity. ADN purificado de sangre completa infectada**

*Termociclador MyCycler (BioRad Hercules CA, USA)

Los primers se diseñaron en sitios conservados de la secuencia de Sal I y otras secuencias del mundo

Purificación y secuenciación

Los productos de PCR se purificaron utilizando MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia CA) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Los productos purificados se secuenciaron en sentido y antisentido con los iniciadores correspondientes por el método Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing (equipo: Perkin Elmer/Applied Biosystems Modelo 3730) en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Análisis de datos

La calidad de las secuencias obtenidas se revisó manualmente y con el software Bioedit 7.1.3 (Ibis Bioscience, Carlsbad, CA 92008). Para cada segmento y aislamiento se obtuvieron las secuencias consenso. Para identificar los haplotipos por gen, todas las secuencias de nucleótidos y aminoácidos se alinearon entre ellas por gen y con la correspondiente de las cepas Salvador-I (Sal I) y Belem que están depositadas en el Gen Bank con números de acceso: para *DBP_{II}*: Sal I,

XM_001608337.1 y Belem, EU395587; para AMA1_{I-II}: Sal I, XM_001615397 y Belem, EU395595 y para MSP1₄₂: Sal I, XM_001614792.1 y Belem, AF435594.

Para el análisis de comparación a nivel global se incluyeron secuencias de estos tres genes de diferentes zonas geográficas depositadas en el Genbank (cuadro 2). Las secuencias del Sur de México y las extraídas del GenBank de las diferentes regiones del mundo se alinearon utilizando el algoritmo de alineamiento múltiple de secuencias ClustalW con el software MEGA 5.10 (Tamura *et al.*, 2011).

Diversidad genética. Se calcularon los índices de diversidad genética: π ($\pi = 2 \sum_{i < j} d_{ij} / (n(n-1))$) el promedio de sustituciones de nucleótidos por sitio entre dos secuencias con corrección de Jukes and Cantor, S - número de sitios de segregación (polimórficos), H - número de haplotipos, HD - diversidad de haplotipos y sus respectivas desviaciones estándar (SD), $\theta: 4N\mu$ (N= tamaño efectivo de la población y μ la tasa de mutación por sitio por generación) diversidad genética, M: Numero de mutaciones s: sinónimas y ns: no sinónimas utilizando el software DnaSP v5 (Librado y Rozas, 2009).

Selección Natural. Para estimar la selección a nivel molecular se compararon las tasas de sustituciones sinónimas versus no sinónimas ($dS-dN$) que se presentaron en los genes *dbpII*, *mSP1₄₂* y *ama1_{I-II}* de los aislados del Sur de México y en el gobal de los aislados del mundo, se utilizó el método de Nei- Gojobori con corrección de Jukes Cantor con un error estándar determinado por replicas con 1000 bootstrap utilizando el software MEGA 5.0. (Tamura *et al.*, 2011).

Diferenciación genética. El índice de diferenciación genética (F_{st}) se obtuvo de la comparación de la diversidad nucleotídica entre poblaciones de *P. vivax* del Sur de México y de otras diferentes zonas geográficas, para cada uno de los genes *dbpII*, *mSP1₄₂* y *ama1_{I-II}*. Las secuencias de nucleótidos de otros sitios geográficos fuera del Sur de México están disponibles en la base de datos del Genbak, los cálculos se realizaron mediante el modelo de los dos parámetros de Kimura 2P con el software DnaSPv5 (Librado y Rozas, 2009).

Polimorfismo antigénico en DBP_{II}, MSP1₄₂ y AMA1_{I-II}.

Se calcularon las frecuencias de cada uno de las sustituciones de amino ácidos para cada proteína en los parásitos de México con lo reportado para otras regiones del mundo. En cada segmento peptídico obtenido se analizó la localización de los polimorfismos y se identificaron los

epítomos de células T y B reportados previamente; para DBP_{II} (Chootong *et al*, 2010), AMA1 (Edmon *et al*, 2007) y MSP1₄₂ (Dias *et al*, 2011). Se analizó la frecuencia en los haplotipos para cada una de las proteínas y del haplotipo producido por la combinación de las tres moléculas y por año (2006 y 2007). Para determinar diferencias en las frecuencias por año se utilizó la prueba exacta de Fisher (95% de significancia).

Cuadro 2. Lista de número de acceso de secuencias de los genes *dbp_{II}*, *ama1_{I-II}*, *mSP1₄₂* extraídas del GenBank por país utilizadas en el análisis genético.

GEN	PAIS	N	NUMEROS DE ACCESO (GENBANK)	REFERENCIA
<i>dbp_{II}</i>	Irán	70	EU860430-EU860436.	Babaeekho <i>et al.</i> , 2009
	India	2	DQ156514, DQ156516	Lim <i>et al</i> , 2005*
		93	FJ491142-FJ491241	Prajapati <i>et al</i> , 2008*
	Brasil	121	EU812839-EU812960	Sousa <i>et al</i> , 2010
	Colombia	17	U50575-U50591	Ampudia <i>et al</i> , 1996
		1	DQ156513	Lim <i>et al</i> , 2005*
	PNG	23	AF289480-AF289483	Xainli <i>et al</i> , 2000
			AF289635-AF289640	
			AF289642-AF289653, AF291096	
		88	AF469515-AF469602	Cole-Tobian <i>et al</i> , 2002
		89	AY970837-AY970925	Cole-Tobian <i>et al</i> , 2005
	Sri Lanka	100	GU143914-GU144013	Premaratne <i>et al</i> , 2009
	Tailandia	30	EF368159-EF368180, EF379127-EF379134	Gosi <i>et al</i> , 2008
	Corea del Sur	30	AF215737-AF215738	Kho <i>et al</i> , 2001
		70	JN989472-JN989484	Hye-Lim <i>et al</i> , 2013
		8	AF220657-AF220663, AF220668	Lim C <i>et al</i> , 2000*
		3	DQ156522-DQ156523, DQ156515	Lim <i>et al</i> 2005*
Myanmar	54	JN255576-JN255586	Hyen-Lim <i>et al</i> , 2012	
<i>ama1_{I-II}</i>	Venezuela	72	EU346015-EU346087	Ord <i>et al</i> , 2008
	Sri Lanka	23	EF218679-EF218701	Gunasekera <i>et al</i> , 2007
	Tailandia	231	FJ784891-FJ785121	Putaporntip <i>et al</i> , 2009
	India	11	EF025187-EF025197	Rajesh <i>et al</i> , 2007
		49	EU282774-EU282822	Thakur <i>et al</i> , 2008
	Irán	6	JF682785-JF682790	Montevalli <i>et al</i> , 2011*
<i>mSP1₄₂</i>	Turquía	30	AB564559 - AB564588	Yildiz <i>et al</i> , 2010
	Corea del Sur	47	HQ171934- HQ171941	Han <i>et al</i> , 2011
		149	JQ446312 - JQ446322	Kang <i>et al</i> , 2012
		4	AF435635-AF435638	Putaporntip <i>et al</i> , 2002
	Singapur	50	GU971656 - GU971705	Lee-Ching <i>et al</i> , 2010
	Bangladesh	5	AF435616-AF435620	Putaporntip <i>et al</i> , 2002
		15	AF199393 - AF199404	Putaporntip <i>et al</i> , 2000
			AF199408 - AF199410	
		58	GQ890917 - GQ890974	Jongwutiwes <i>et al</i> , 2010
		20	AF435596 - AF4355615	Putaporntip <i>et al</i> , 2002
	Brasil	8	AF435622 - AF435625, AF435627	Putaporntip <i>et al</i> , 2002
				AF435629 - AF435631
		3	AF199405 - AF199407	Putaporntip <i>et al</i> , 2000
	India	28	EU430452 - EU430479	Thakur <i>et al</i> , 2008
		1	AF435639	Putaporntip <i>et al</i> , 2002
	Sri Lanka	95	GU175174 - GU175268	Dias <i>et al</i> , 2010
		11	AJ292359 - AJ292349	Monamperi <i>et al</i> 2005*

*secuencias registradas directamente al GenBank

RESULTADOS.

De un total de 99 muestras de ADN de sangres infectadas con *P. vivax*, de 35 aislados se obtuvo un producto de PCR suficiente para purificar y secuenciar el gen *dbpII*. De estas muestras también se amplificó el segmento de los genes *amaI_{I-II}* y *msp1₄₂*.

Polimorfismo genético en *dbpII*, *msp1₄₂* y *amaI_{I-II}* de *P. vivax* del Sur de México.

En las 35 secuencias del segmento *dbpII* (574-1678 nucleótidos) y con respecto a la cepa Sal I se encontraron 14 sitios polimórficos entre los nucleótidos 924 y 1652 de la región codificante que produjeron 8 haplotipos (Figura 1A). Trece de los 14 cambios de nucleótidos fueron no sinónimos (92%), el único cambio sinónimo se presentó en el codón 530 (aac→aat). Los cambios de nucleótidos no sinónimos en los codones fueron: cinco en la primera posición, cinco en la segunda y tres en la tercera. Tres cambios no sinónimos fueron encontrados en todas las secuencias del Sur de México (codones 137, 145 y 277) y los codones 503 Ile/Lys (ata→aaa), 424 Leu/Ile (tta→ata), 417 Asn/Lys (aat→aaa) y 437 Trp/Arg (ttg→cgg) presentaron una frecuencia del 91.4%, 88.5% y 85.7% de los parásitos, respectivamente y fueron homólogos con la secuencia de la cepa Belem (Figura 1A).

Se obtuvo la secuencia de nucleótidos para *amaI_{I-II}* de 34 parásitos (376-1260 nt; dos tercios del dominio I y todo el dominio II). En comparación con la cepa de referencia Sal I se encontraron 17 cambios de nucleótidos (Figura 1B). Trece de estos en el fragmento comprendido entre los nucleótidos 390 y 729 (Dominio I) y los otros cuatro polimorfismos distribuidos en el segmento 730 y 1260 (Dominio II), produciendo un total de siete haplotipos. En todas las secuencias, se detectó un cambio sinónimo de nucleótido en la tercera posición del codón 137P (cca→ccc) y dos cambios no sinónimos en las posiciones 145 Glu/Ala (gaa→gca) y 277 Glu/Lys (gag→aag). Para los haplotipos I y VI, el codón 228 fue completamente diferente Ser/Asp (agc→gat). Los 16 cambios de nucleótidos no sinónimos se encontraron con similar frecuencia en las tres posiciones del codón: seis para la primera, seis en la segunda y cuatro en la tercera posición. Una sustitución en el residuo 141 Ala/Glu (gcg→ggg) se encontró en la mayoría de aislados del Sur de México también observada en la secuencia de la cepa Belem.

Figura 1A. Polimorfismo de los residuos de amino ácidos de DBP_{II} de *Plasmodium vivax* del Sur de México obtenidos durante 2006 y 2007.

Residuo*: n	220	308	371	384	385	386	390	417	424	437	489	490	497	499	501	503	529	551
Sal I*	Gly	Arg	Lys	Asp	Glu	Lys	Arg	Asn	Leu	Trp	Thr	Arg	Val	Ser	Lys	Ile	Glu	Val
Haplotipo:																		
I_{dbpII}	2	Lys	Ile	Arg	Lys	.	.	.
II_{adbpII}	5	Glu	Ser	Glu	Gly	Lys	Asn	.	Lys	Ile	Arg	.	.	.	Lys	.	.	.
III_{dbpII}	1	.	.	Glu	Gly	Lys	Asn	.	Lys	Ile	Arg	.	.	.	Lys	.	.	.
II_{CdbpII}	1	Glu	Ser	Glu	.	.	.	Lys	Ile	Arg	Lys	.	.	.
III_{dbpII}	2	.	.	.	Gly	.	.	His	Lys	Asp	.
IV_{dbpII}	1	Glu	.	.	Gly	.	.	Lys	Ile	Lys	.	.	.
V_{adbpI}	1	.	.	.	Gly	.	.	His
V_{dbp}	1	.	.	.	Gly	.	.	His	Lys	.	.	.
Belem*	Glu	Ser	Glu	Gly	Lys	Asn	.	Lys	Ile	Arg	Ser	Thr	Ala	Lys	Gly	Lys	.	.

*Cepas de referencia: Sal I, XM_001608337.1; Belem, EU395587 ; Nucleótidos 574-1678 n, número de muestras

Figura 1B. Polimorfismo de los residuos de amino ácidos de AMA1_{I-II} de *P. vivax* del Sur de México obtenidos durante 2006 y 2007.

Residuo: N	130	132	140	141	145	189	190	227	228	277	288	352	368	380	384
Sal I	Asn	Asn	Leu	Ala	Glu	Glu	Lys	Glu	Ser	Glu	Gly	Lys	Lys	Gln	Leu
Haplotipo:															
I_{ama1}	16	.	.	Ile	.	Ala	.	Val	Asp	Lys	.	.	Ile	.	Pro
II_{ama1}	9	Lys	Asp	.	Glu	Ala	Asn	.	.	Lys	.	Asn	.	.	.
II_{bama1}	1	.	.	.	Glu	Ala	Lys	.	.	Lys	.	Asn	.	.	.
III_{ama1}	4	.	.	.	Glu	Ala	Lys	Gln	.	Lys	.	Asn	.	.	.
IV_{ama1}	2	.	.	Ile	.	Ala	.	.	.	Lys	.	.	Ile	.	Pro
V_{ama1}	1	Lys	Asp	.	Glu	Ala	.	.	.	Lys	.	Asn	.	.	.
VI_{ama1}	1	.	.	.	Glu	Ala	Lys	Gln	Val	Asp	Lys
Belem	.	.	.	Glu	Ala	Lys	E	.	.	Arg	.

Cepas de referencia: Sal I, XM_001615397; Belem, EU395595; Nucleótidos 376-1260 n, número de muestras

Del segmento *msp1*₄₂ (4060- 5131 nt) se obtuvieron 34 secuencias de nucleótidos con 1071 pb, comparado con Sal I se encontraron 53 sitios polimórficos en el fragmento *msp1*₃₃ comprendido entre los nucleótidos 4060 y 4875 produciendo nueve haplotipos, pero no se encontró ningún cambio en el fragmento *msp1*₁₉ (Figura 1C). La mayoría de los cambios fueron no sinónimos. Cinco cambios fueron sinónimos e identificados en los codones 1356 E (gag→gaa), 1357 A (gca→gcg), 1509 E (gaa→gag), 1533 T (ctg→ttg) y 1538 P (ccg→cca). Al igual que en *dbpII* y *amaI*_{I-II}, los cambios de nucleótidos se presentaron en las tres posiciones de los codones; 19 cambios en la primera, 14 en la segunda y 19 en la tercera. Se encontraron 7 cambios sinónimos, en la posición 1357 (gca→gcg). Treinta y tres de estos cambios también fueron identificados en la secuencia de la cepa Belem. Las distintas secuencias de *P. vivax* de México contenían segmentos homólogos con las secuencias de las cepas Sal I y Belem pero de longitud variable.

Figura 1C. Polimorfismo de los residuos de amino ácidosde MSP1₄₂ de *Plasmodium vivax* del Sur de México obtenidos durante 2006 y 2007.

Residuo AA*:	n	1361	1432	1454	1466	1476	1482	1490	1491	1493	1494	1495	1496	1501	1505	1506	1508	1509	1510	1511	1513	1514	1515	1516	1517	1518	1519	1520	1521	1522	1524	1525	1526	1527	1625		
Sal I		Ala	Ser	Ile	Met	Thr	Gly	Asp	Gly	Lys	Thr	Glu	Ile	Asp	Lys	Gln	Glu	Glu	Leu	Lys	Leu	Gly	Asn	Val	Asn	Ser	Gln	Asp	Ser	Lys	Asn	Glu	Thr	Gln	Leu	Asn	Lys
Haplotipo:																																					
Ia _{msp1}	13	.	.	Leu	Lys	Ala	Thr	His	.	Lys	.	Gln	.	.	Ser	Glu	Val	.	.	Asn	.	Glu	Thr	Gln	Leu	Asn	.	.	.	
Ib _{msp1}	3	.	.	.	Lys	Thr	His	.	Lys	.	Gln	.	.	Ser	Glu	Val	.	.	Asn	.	Glu	Thr	Gln	Leu	Asn	.	.	.	
IC _{msp1}	1	.	.	Leu	Lys	Ala	Thr	His	.	Lys	.	Gln	.	.	Ser	Glu	Val	.	.	Asn	.	Glu	Thr	Gln	Leu	Asn	Glu	.	.	
Id _{msp1}	1	.	.	.	Lys	Thr	His	.	Lys	.	Gln	.	.	Ser	Glu	Val	.	.	Asn	.	Glu	Thr	Gln	Leu	Asn	.	.	.	
II _{msp1}	8	Glu	.	Leu	Lys	Ala	Glu	Thr	Ala	Asn	Ala	Gln	.	Thr	Ile	Glu	.	Glu	Ala	Asn	Lys	Thr	Ala	Glu	Ala	Lys	.	Thr	.	.	.	
III _{msp1}	4	Glu	.	Leu	Lys	.	.	Thr	Ala	Asn	Glu	.	Val	Ala	Ala	Glu	Asp	Lys	Ile	.	Ile	.	Ser	Gly	Ser	Thr	Lys	Thr	Thr	Glu	Thr	Gln	Ser	Met	.	.	
IVa _{msp1}	2	Glu	.	Leu	Lys	Ser
IVb _{msp1}	1	Glu	.	Leu	Lys	Ala	Arg
V _{msp1}	1	.	.	Leu	Lys	.	Glu	Gln	.	Thr	His	.	.	.	Gln	.	.	Ser	Glu	Val	.	.	Asn	.	Glu	Ala	Gln	Leu	Asn	.	.	.	
Belem		.	Pro	.	Lys	.	.	Thr	Ala	Asn	Glu	.	Val	Ala	Ala	Glu	Asp	Lys	Ile	.	Ile	.	Ser	Asp	Ser	Thr	Lys	Thr	Thr	Glu	Thr	Gln	Ser	Met	.	.	

n, número de aislados; AA, amino ácido

Cepas de referencia: *Sal I, M75674, Nucleótidos 4,060-5133nt; Belem, AF435594

Diversidad genética.

Debido a que muchas de las secuencias depositadas en el Genbank para estos genes en parásitos de otros sitios geográficos fueron más cortas que las obtenidas para *P. vivax* de México, las secuencias obtenidas de los genes *dbpII*, *amaI_{I-II}* y *mspI₄₂* se recortaron (lo menos posible a tamaños moleculares que aún incluyen la mayoría de las sustituciones), lo que permitió incorporar un grupo grande de secuencias en los análisis. Para *dbpII*: el segmento de 1104 pb (574-1678nt) se recortó a 663 pb (881 – 1543 nt), el cambio sinónimo en el codón 530 y los tres cambios no sinónimos en los codones 220, 529 y 551 no se incluyeron en los análisis, el segmento de 663 pb cuenta con diez mutaciones no sinónimas; para *amaI_{I-II}*: el segmento de 884 pb (376-1260 nt) se recortó a 780 pb (376 – 1155 nt) sin exclusión de algún polimorfismo y para *mspI₄₂* el segmento de 1071 pb (4060-5131nt) se recortó a 981 pb (4,150-5131) se excluyeron de la región terminal 5' los codones 1356, 1357 (cambios sinónimos) y 1361 (cambio no sinónimo).

Para *dbpII* además de las secuencias obtenidas en este trabajo se incluyeron secuencias de otros sitios geográficos; Brasil, Colombia, Irán, India, Corea del Sur, Sri Lanka, Tailandia, Myanmar, Papúa Nueva Guinea, haciendo un total de 835 secuencias y 265 haplotipos (HD 0.9723) (Cuadros 2 y 3). La diversidad nucleotídica (π), genética (θ) y de haplotipos (HD) en los aislados de México fue la más baja comparada con parásitos de Sudamérica (Brasil y Colombia) y de otros continentes, e independiente del número de parásitos analizados por cada región (Cuadro 3). Los índices más altos se presentaron en parásitos de Tailandia (π 0.01175) > Myanmar (π 0.01025) > Sri Lanka (π 0.00980) > Papúa Nueva Guinea (π 0.00977) > Colombia (π 0.00910). Similarmente, los grupos de parásitos con mayor diversidad genética también mostraron los valores de diversidad de haplotipos más altos. En los aislados de México se detectaron siete haplotipos a excepción de Irán y Corea del Sur, con los valores más bajos de todos los grupos analizados (Cuadro 3). Cinco de los siete haplotipos de *dbpII* de México han sido reportados para Brasil y en otras regiones geográficas fuera de América, sólo dos haplotipos fueron exclusivos para México.

Para *amaI_{I-II}* se incluyeron secuencias de Venezuela, Tailandia, India, Irán, Sri Lanka. La diversidad encontrada en parásitos de México para *amaI_{I-II}* (π 0.00852; θ 0.0017) fue mayor que para *dbpII*. (Cuadros 2 y 3). Solo los aislados de Venezuela (único país del continente Americano distinto de México incluido en el análisis) resultaron con menor diversidad que México aunque el número de haplotipos (H 17, HD 0.907 \pm 0.015) y los sitios polimórficos no sinónimos (n=16) fueron

más numerosos que los encontrados en los aislados de México. De forma similar, en *dbpII*, los aislados de Asia (Tailandia y la India) mostraron una mayor diversidad, un mayor número de cambios sinónimos y una diversidad nucleotídica similar a la global (0.01077), con un total de 185 haplotipos y HD 0.9732 (Cuadro 3). Dos de los siete haplotipos de *amaI_{I-II}* encontrados en parásitos de México, fueron detectados en Venezuela, los otros cinco haplotipos fueron exclusivos para el Sur de México.

Para los análisis del segmento *mspI₄₂* se incluyeron parásitos de Turquía, Corea del Sur, Singapur, Papúa Nueva Guinea, Tailandia, Brasil, India, Sri Lanka. Los *P. vivax* de México mostraron una diversidad genética (π 0.01824 \pm 0.00192) más alta que los parásitos de Turquía y Corea del Sur (Cuadro 3). Los parásitos de otras regiones fueron los más diversos, entre ellos los de Brasil (único país del continente americano con información) (Cuadro 3), comparable a la diversidad global (HD 0.9835 \pm 0.0024). Consistentemente con los genes *dbpII* y *amaI_{I-II}*, el mayor número de haplotipos para *mspI₄₂* se presentó en Asia (Tailandia y Sri Lanka). En los *P. vivax* de México, uno de los nueve haplotipos detectados para *mspI₄₂* fue detectado en las secuencias de Brasil, Turquía y Sri Lanka y otros dos haplotipos en las secuencias de parásitos de Tailandia, los otros cinco haplotipos fueron exclusivos para parásitos del Sur de México.

La relación del número de mutaciones con el número de haplotipos varió para los tres genes y según la procedencia geográfica. Para *dpbII* y *amaI_{I-II}* el cociente fue consistentemente mayor de 1.0, excepto para Brasil y Sri Lanka y para Tailandia e India, este fue menor de 1.0, respectivamente. En Tailandia e India se encontró que *amaI_{I-II}* mostró un mayor número de haplotipos que de mutaciones pero no para *dbpII* y *mspI₄₂*. Para *mspI₄₂*, en todos los sitios geográficos la relación fue mayor de 1.0 (Cuadro 3).

Selección Natural y Recombinación.

Las sustituciones no sinónimas fueron significativamente más numerosas que las sinónimas en los tres genes, el valor de dNS – dS fue consistentemente > 1.0. Por otro lado, los análisis de recombinación en *dbpII* y *amaI_{I-II}* mostraron uno y tres posibles eventos de recombinación, respectivamente. En *mspI₄₂* se encontraron nueve eventos mínimos de recombinación y cuando se calcularon los eventos para los datos globales, estos se incrementaron significativamente (Cuadro 4). Cabe mencionar que casi la mitad de los eventos determinados a nivel global fueron detectados en las

Cuadro 3. Comparación de los índices de diversidad genética de *P. vivax* del Sur de México y de otras regiones geográficas del mundo.

¹ <i>dbp</i> _{II}	n	s	H	HD ± (DE)		π ± (DE)		θ ± (DE nr, fr)		M	S	NS	C (M/H)
MX	35	10	7	0.553	(0.092)	0.00406	(0.00078)	0.00366	(0.00155, 0.00116)	10	0	10	1.42
IRN	70	10	7	0.757	(0.030)	0.00618	(0.0030)	0.00313	(0.00125, 0.00099)	10	1	9	1.42
IND	95	36	33	0.912	(0.019)	0.00814	(0.00048)	0.01059	(0.00308, 0.00177)	38	5	33	1.15
BR	121	20	34	0.933	(0.012)	0.00829	(0.00034)	0.00562	(0.00179, 0.00126)	20	3	17	0.58
CL	18	16	17	0.993	(0.021)	0.0091	(0.00069)	0.00702	(0.00292, 0.00175)	16	0	16	0.94
PNG	201	71	71	0.914	(0.012)	0.00977	(0.00033)	0.01822	(0.00442, 0.00216)	72	15	57	1.01
SLK	100	27	39	0.922	(0.014)	0.00980	(0.00054)	0.00787	(0.00239, 0.00151)	27	3	24	0.69
TL	30	38	24	0.982	(0.014)	0.01175	(0.00098)	0.01449	(0.00496, 0.00235)	39	4	35	1.6
CS	111	62	21	0.778	(0.028)	0.0570	(0.00088)	0.01770	(0.00470, 0.00225)	67	14	53	3.19
MYA	54	27	12	0.87491	(0.029)	0.01025	(0.00060)	0.00894	(0.00292, 0.00172)	27	3	24	2.25
Total	835	157	265	0.9655	(0.03)	0.01014	(0.00024)	0.03388	(0.00666, 0.00270)	174	30	140	0.65

² <i>ama1</i> _{I-II}	n	s	H	HD ± (DE)		π ± (DE)		θ ± (DE nr, fr)		M	S	NS	C (M/H)
MX	34	14	7	0.709	(0.06)	0.00852	(0.00044)	0.00439	(0.00172, 0.00117)	14	1	13	2.0
VNZ	73	16	17	0.907	(0.015)	0.00682	(0.00024)	0.00422	(0.00148, 0.00106)	16	2	14	0.94
SLK	23	25	15	0.949	(0.028)	0.01017	(0.00092)	0.00868	(0.00236, 0.00174)	26	2	24	1.73
TL	231	37	89	0.927	(0.012)	0.01052	(0.0003)	0.00788	(0.00207, 0.00130)	41	8	33	0.46
*IND	60	34	51	0.993	(0.005)	0.01081	(0.00035)	0.00935	(0.00291, 0.00160)	36	8	28	0.7
IRN	6	29	6	1	(0.096)	0.0153	(0.003)	0.01628	(0.00808, 0.00302)	29	3	26	4.83
Total	427	52	185	0.9732	(0.0038)	0.01077	(0.00019)	0.01005	(0.00235, 0.00139)	59	12	47	0.31

³ <i>msp1</i> ₄₂	N	s	H	HD ± (DE)		π ± (DE)		θ ± (DE nr, rl)		M	S	NS	C (M/H)
MX	34	49	8	0.787	(0.048)	0.01824	(0.00192)	0.0122	(0.00399, 0.00175)	56	6	50	7.0
TQ	30	27	3	0.536	(0.077)	0.00735	(0.00158)	0.00695	(0.00247, 0.00134)	27	5	22	9.0
CS	200	47	10	0.871	(0.006)	0.01633	(0.00064)	0.00816	(0.00209, 0.00119)	50	3	47	5.0
SNG	50	89	27	0.898	(0.031)	0.01914	(0.00144)	0.02025	(0.00592, 0.00215)	50	13	84	1.85
BG	5	39	3	0.7	(0.218)	0.01916	(0.0061)	0.1908	(0.00985, 0.00306)	43	3	40	14.33
TL	93	55	43	0.965	(0.009)	0.02259	(0.0006)	0.01098	(0.00303, 0.00148)	62	4	58	1.44
BR	11	53	8	0.945	(0.054)	0.02287	(0.00309)	0.01845	(0.00758, 0.00253)	58	5	53	7.25
IND	29	59	26	0.99	(0.013)	0.02426	(0.00075)	0.01531	(0.00508, 0.00199)	67	8	59	2.57
SLK	106	63	47	0.969	(0.003)	0.02425	(0.00045)	0.01227	(0.00327, 0.00155)	70	9	61	1.49
Total	558	111	175	0.9835	(0.0024)	0.02388	(0.00028)	0.01728	(0.00369, 0.00164)	125	20	105	0.71

¹663pb, ²780pb, ³981pb. N: número de aislados, S: sitios polimórficos, H: número de haplotipos, DE: desviación estándar, nr: no recombinación, rl:recombinación libre, π: diversidad nucleotídica, θ: diversidad genética, M: número de mutaciones: s: sinónimas, ns: no sinónimas. C, cociente. MX, México; IRN, Irán; IND, India ;BR, Brasil; CL, Colombia; PNG, Papúa Nueva Guinea; SLK, SriLanka; TL, Tailandia; CS, Corea del Sur; MYA, Myanmar; VNZ, Venezuela; SNG, Singapur; BG, Bangladesh; TQ, Turquía.

*son secuencias reportadas directamente en el Gen Bank, es posible que correspondan a los haplotipos encontrados en un grupo más grande de muestras.

secuencias de parásitos de México. En *dbpII* y *mSP142* se encontró que el índice R^2 de desequilibrio de ligamiento (DL) declinó conforme aumentó la distancia nucleotídica y en *ama1I-II* no se encontró un valor significativo. En *mSP142* los valores más altos de recombinación se encontraron entre los nucleótidos 4,518 y 4,570.

Cuadro 4. Selección natural y Recombinación en genes del merozoíto de *P. vivax* en México y el mundo.

	<i>dbpII</i>		<i>ama1I-II</i>		<i>mSP142</i>	
	México	Mundial	México	Mundial	México	Mundial
dNS – dS:	3.106 (P = 0.0029)	2.907 (P = 0.004)	2.808 (P = 0.006)	2.255 (P = 0.026)	2.646 (P = 0.0099)	3.429 (P = 0.001)
Rm:	1	17	3	16	9	23
C en el segmento:	0.001	25.1	2	92.3	3.2	26
C en sitios adyacentes:	0	0.0379	0.0026	0.1185	0.003	0.0265

dNS: razón de sustituciones no sinónimas; dS: razón de sustituciones sinónimas, Rm: eventos mínimos de recombinación en la muestra; C: parámetro de recombinación.

Diferenciación genética

En el Cuadro 5 se muestran los índices F_{st} para los genes *dbpII*, *ama1I-II*, *mSP142* entre parásitos de *P. vivax* de distintas regiones. Para todos los genes la mayoría de los índices de diferenciación fueron altos, entre 0.176- 0.315 para *dbpII*. Los índices más bajos fueron entre Tailandia y Myanmar, India y Sri Lanka e India y Brasil. Para *ama1I-II*, los índices de diferenciación fueron en general más bajos que los otros genes, los parásitos de México los demás países 0.109- 0.201. A pesar que el índice fue muy bajo entre parásitos de México e Irán, de Irán se incluyeron únicamente seis haplotipos depositados directamente en el GenBank pero no se tiene información sobre la población estudiada y la frecuencia de estos haplotipos. Mientras para *mSP142* los índices de diferenciación fueron más altos que *dbpII* y *ama1I-II*, consistentemente fueron para parásitos de

Turquía, los más divergentes del mundo. También los índices más bajos fueron entre Brasil e India, India y Sri Lanka, Tailandia e India. Los índices *Fst* fueron más altos para *dbpII* entre México y Colombia/Brasil, países de América. Similar para *amaI_{I-II}* entre Tailandia y Venezuela. Para *msp1₄₂* el índice de diferenciación de parásitos de México fueron más bajos con India, Sri Lanka y Brasil, respectivamente.

Distribución temporal de los haplotipos para *dbpII*, *amaI_{I-II}* y *msp1₄₂*

En el 2006 y 2007, la frecuencia de los haplotipos fue distinta, en general se encontró un mayor número de alelos en los parásitos analizados del 2006. De los ocho haplotipos encontrados en *dbpII*, el 100% se detectaron en el 2006 y tres de estos en el 2007 (8.5%). El haplotipo I_{*dbp*} se presentó con mayor frecuencia en el grupo 2007 (89%) que en el 2006 (41%), respectivamente ($p= 0.00298$) (Figura 2). De manera similar, para *amaI_{I-II}* los siete haplotipos detectados en la muestra del 2006, el haplotipo I_{*amaI*} fue el de mayor frecuencia con 50% y en el 2007 con 66% ($p= 0.32218$) (Figura 2). Para *Pvmsp1₄₂*, ocho de los nueve haplotipos detectados, en el 2006, el haplotipo II_{*msp1*} fue el de mayor frecuencia (35%). En el 2007 el haplotipo III_{*msp1*} de baja frecuencia en la muestra del 2006 (17%) fue de mayor frecuencia en el grupo del 2007 (64%) ($p=0.00148$). La integración de los tres genes resolvió 16 haplotipos (A→O), tres de éstos se detectaron en ambos años, nueve fueron detectados sólo en la muestra del 2006. De los cuatro detectados sólo en la muestra del 2007, el haplotipo A fue significativamente el más frecuente (59%) ($p= 0.00024$) (Figura 2; Anexo 1).

Polimorfismo antigénico

Con base en la secuencia de aminoácidos para DBP_{II} y AMA1 se identificaron siete haplotipos distintos y para MSP1₄₂ fueron nueve haplotipos (Figura 1). En la figura 3 se muestra la alineación de las secuencias de aminoácidos indicando los residuos que participan en los epítomos B y T: en DBP_{II} se presentaron polimorfismos en los epítomos B: H1, H3, L3, M2 y M3 (Chootong *et al*, 2010); el residuo Arg308Ser del epítomo H1; K371Glu del epítomo L3; Asp84Gly, Glu385Lys, Lys386Asn y Arg390His del epítomo H3; Asn417Lys y Leu424Ile en el epítomo M2; y Trp437Arg en el epítomo M3. En AMA1_{I-II} los residuos Leu140Ile, Ala141Glu y Glu145Ala se encuentran adyacentes al residuo Asn142 que está señalado como un sitio que participa en el epítomo reconocido

por el anticuerpo monoclonal 1F9 (Edmon *et al*, 2007). Por último, en MSP1₄₂ solo se encontró un cambio de aminoácido en un residuo situado en uno de los epítomos de células T (Gly1482Glu) (Dias *et al*, 2011). En el anexo 2 se observa que las sustituciones encontradas en las tres proteínas aquí estudiadas fueron también encontradas en parásitos de otros sitios geográficos aunque la proporción fue variable, la única sustitución no sinónima exclusiva del sur de México fue la encontradas en la el codón 1,625 de la proteína MSP1₄₂.

Cuadro 5. Índice de diferenciación genética (F_{ST}) de *P. vivax* del Sur de México

<i>dbp_{II}</i>	MX	IRN	IND	BR	CL	PNG	SLK	TL	CS
MX									
IRN	0.19507								
IND	0.24768	0.08448							
BR	0.23085	0.0661	0.01299						
CL	0.31573	0.2014	0.16406	0.1389					
PNG	0.27996	0.18831	0.14384	0.1263	0.20578				
SLK	0.26944	0.11074	0.0263	0.03165	0.17758	0.13828			
TL	0.1767	0.14707	0.07645	0.06227	0.19224	0.12056	0.08901		
CS	0.26014	0.18471	0.12223	0.13406	0.29921	0.22521	0.12947	0.13699	
MYA	0.20406	0.1521	0.08108	0.08463	0.23642	0.14528	0.0993	0.00159	0.12867
<i>ama1_{I-II}</i>	MX	VNZ	SLK	TL	IND				
MX									
VNZ	0.19416								
SLK	0.14529	0.16826							
TL	0.20134	0.19416	0.08507						
IND	0.10901	0.13955	0.07401	0.09349					
IRN	0.02919	0.04323	0.04343	0.06964	-0.04555				
<i>msp1₄₂</i>	MX	TQ	CS	SNG	BG	TL	BR	IND	
MX									
TQ	0.13968								
CS	0.27961	0.50696							
SNG	0.23436	0.40646	0.32212						
BG	0.2942	0.48444	0.07688	0.1825					
TL	0.17673	0.38036	0.27606	0.04224	0.18893				
BR	0.09897	0.35548	0.22295	0.27547	0.23223	0.11297			
IND	0.06973	0.28881	0.14187	0.14732	0.12053	0.04224	0.01546		
SLK	0.08658	0.29778	0.20997	0.15314	0.1851	0.03655	0.03770	-0.0044	

MX, México; CLB, Colombia; BR, Brasil; IRN, Irán; IND, India; SLK, Sri Lanka; TL, Tailandia; CS, Corea del Sur; PNG, Papúa Nueva Guinea; SNG, Singapur; TQ, Turquía; BG, Bangladesh; VNZ, Venezuela; MYA, Myanmar

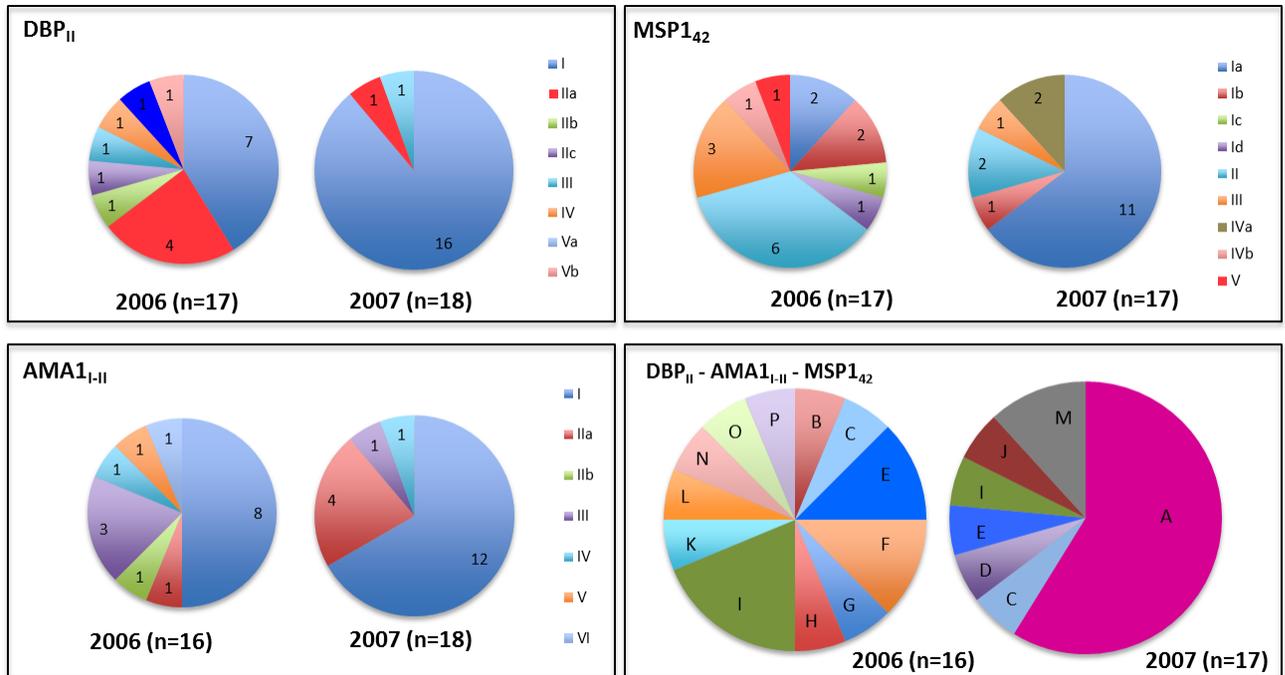


Figura 2. Cambios en la distribución temporal de los haplotipos *dbp_{II}*, *ama1_{I-II}* y *msp1₄₂* de *P. vivax* en el Sur de México.

DBP_{II}
 192 NNLVMLDVET 55NGQPAGTL DNVLEFVTGH EGN5SRKNSSN GGNPYDIDHK KTISSAIINH AFLQNTVMKN **C**NYVKKRRER
 272 DWDCNTKKDV **C**IPDRRYQL **C**⁴MKELTNLVNN TDTNFHR/**S**DIT FRKLYLKRKL IYDAAVEGDL LLLKNNVRYN KDF**C**⁵KDIRWS
 352 **L**GFDFDIIMG TDMEGIGYSK VVNNLRISF **G**TEKAQQRK KOWWNESKAQ IWTAMMYSVK KRL**K**GNFIW**I****C**⁶KLNVAVNIE
 432 PQIYRWIREW GRDVSSELPT EVQKLKEK**C**D GKINVTDKKV CKVPPQONAC KSYDQWITRK KNQWDVLSNK FISVKNAEKV
 502 QTAGIVTPYD ILKQELDEFN EVAFENEINK RDGAVIEL**C**V CSVEEAKK 560

Epitopos B: L4 L1 H1 H2 M1 L3 H3 L2 M2 M3 (Chootong et al, 2010). El recuadro se señala el motivo de unión al eritrocito entre la cisteína 4 y 6.

AMA1_{I-II}
 126 FAFP**N**ANDHI SPMT**L**AN**L**KE RYKDNVEMMK LNDIAL**C**RT**H**AASFVMAGDQ NSSYRHPAVY DEK**E**K**T****C**HML YLSAQENMGCP
 206 RY**C**SPDAQNR DAV**F****C**FKPDK **N**ESFENLVYL SKNVRNDWDK **K****C**PRK**N**LGN**A** KFGLWVDG**N****C** EEIPVYKEVE **A****E**DL**R****E****C****N****R****I**
 286 **V**FGASASDQP **T**QVEE**M**TDY OKIOOGFRON NREMIKSAFL PVGA**F**NSDNF KSKGRGFNWA NFD**S**V**K****M****K****C****V**IFNTKPT**C****L****I**
 366 **N**DK**N**FIATTA L**S**H**P**Q**E****V****D****L****E** **F****P****C**SIYKDEI EREIKKQSRN MNLYSV**D**GER IVLPR 420

Epitopos B propuestos para anticuerpos monoclonales: 1F9, 4G2, 58F8/DV5 (Edmon J et al, 2007). El recuadro delimita al dominio II

MSP1₄₂
 1354 TGEAESEAPE ILVPAGISDV DVVYLKPLAG MYKTIKKOLE NHVNAFNTNI TDMLDSRLKK RNYFLEVLNS DLNPFKYSS
 1434 **G**EVIIKDPYK **L**LDLEKKK**L** **I**GSYK**V**IGAS **I**DMDLATAND **G**VTY**N**K**M**GE **L**YK**T**HL**D**G**V**K **T**EIK**K**VE**D**DI **K**K**Q**E**E**L**K****K****L**
 1514 **G****N****V****N****S****Q****D****S****K** **N**E**F**I**A**K**K**AEL EKYL**P**FL**N****S****L** **O**KEVESLVSK VNTYTD**N**L**K**K **V**IN**N****C**OLE**K**K EA**E**IT**V**K**L**Q **D**Y**N**K**M**DE**K****L**
 1594 **E**YV**K**SE**K**KNE **V**K**S**GLLE**K**L **M****H**SK**L**IKENE **S**KEIL**S**QL**L****N** **V**Q**T**Q**L**L**T**M**S**S EHTC**I**D**T****N****V**P **D****N**A**A****C****Y****R****V****L****D** **G**T**E**E**W****R****C****L****L****T**
 1674 **F****K****E****E****G****G****K****C****V**P **A****S****N****V****T****C****K****D****N****N** **G****G****C****A****P****E****A****E****C****K** **M****T****D****S****N****K****I****X** 1711

Epitopo B configuracional, epitopos T HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*0401, HLA-DRB1*0701 and HLA-DRB1*1101 (Dias S et al, 2011). El recuadro indica el fragmento de 19kD (ref)

Figura 3. Polimorfismo en epítomos B y T en las secuencias de amino ácidos de DBP_{II}; AMA1_{I-II} y MSP1₄₂ de *Plasmodium vivax*. En negritas se indican las sustituciones de amino ácidos identificados en parásitos del Sur de México; En rojo se señalan las cisteínas conservadas

DISCUSION

En este estudio se analizó el polimorfismo genético y antigénico de moléculas del merozoíto *dbpII*, *mSP142* y *ama1_{I-II}* de *P. vivax* que participan en la invasión al eritrocito inmaduro humano, obtenidos de pacientes del Sur de México durante 2006-2007. Los estudios de diversidad poblacional que analizan moléculas candidatas para vacunas proporcionan información valiosa para la vigilancia molecular (Arnott *et al.*, 2012) y el impacto de la diversidad genética sobre la eficacia de vacunas (Cui *et al.*, 2003).

En México la transmisión del paludismo por *P. vivax* es histórica, en los 90's se registraban más de 120 mil casos por año, cifra que se fue reduciendo debido al control del vector y tratamiento de pacientes (http://digepisalud.gob.do/boletines/otras-publicaciones/cat_view/33-otras-publicaciones/63-boletines-semanales.html;
<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/032ssa202.html>;
http://www.cenavece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/nom_032_ssa2_2010_norma_petv.pdf). Desde el año de 1999 el tratamiento de pacientes ha consistido en la aplicación de dosis únicas intermitentes que si bien no eliminan los hipnozoítos, la intención ha sido suprimir la infección sanguínea. A partir de entonces y a través de los años, el número de casos de paludismo en el Sur de México se fueron reduciendo de forma gradual, siendo el año 2005 donde se registró el menor número de casos en el Sur de México (la Jurisdicción VII de Chiapas). Después del azote del huracán Stan en la región, ocurrió un incremento de casos en los años 2006-2007 principalmente en el pie de montaña.

Los resultados mostraron que los genes *dbpII*, *mSP142* y *ama1_{I-II}* de *P. vivax* del Sur de México con transmisión inestable e hipoendémica difieren en el grado de diversidad genética, pero dicha diversidad fue consistentemente menor que la diversidad de parásitos de Sudamérica y de otros continentes. La diversidad genética en *P. vivax* no se encontró asociada a la intensidad de la transmisión de las diferentes regiones. Para *mSP142*, la diversidad genética fue menor en parásitos de Turquía y Papúa Nueva Guinea (PNG). Para el gen *ama1*, la diversidad genética más baja que para parásitos de Venezuela y México aunque la diversidad de haplotipos fue mayor para Venezuela. Los parásitos de una zona de alta transmisión de Venezuela presentaron la diversidad más baja para *ama1_{I-II}* (Moon *et al.*, 2008). Este resultado es similar a lo reportado en Tailandia para el gen

completo (Putaporntip *et al.*, 2009), pero contrasta con parásitos de Sri Lanka donde la transmisión de *P. vivax* es inestable y de baja intensidad (Gunasekera *et al.*, 2007; Premarante *et al.*, 2011), mientras el gen *dbpII* mostró una diversidad genética similar a la reportada para una zona hiperendémica, como PNG (Xainli *et al.*, 2000). La hipo endemia y los cambios en la transmisión que han prevalecido en el Sur de México, parecen ser la causa de la baja diversidad genética encontrada en los genes del merozoíto. Debido a que el número de casos del Sur de México fue decreciente desde el año 2000 y hasta 2005, también es posible que haya ocurrido pérdida de genotipos en la región (Joy *et al.*, 2008; Gonzalez-Ceron *et al.*, 2013). De hecho, la expansión de casos en los años 2006-2007 podría corresponder a algunos genotipos prevalentes en los años 2004-2005. Los pacientes afectados por *P. vivax* del Sur de México han sido tratados con Cloroquina y Primaquina en dosis únicas intermitentes, las cuales no eliminan los hipnozoitos, los parásitos podrían existir como reservorio de genotipos que contribuyen a mantener la diversidad parasitaria (Gonzalez-Ceron *et al.*, 2013), sin embargo, la constante administración de medicamentos pudo haber impactado la infección sanguínea que causan las recaídas y en consecuencia la reducción de casos y la diversidad genética.

La diversidad genética en los parásitos de *Plasmodium* se genera primeramente por mutación, y posteriormente, de manera frecuente, por recombinación (Dias *et al.* 2011, Cole-Tobian *et al.* 2003). El exceso de cambios no-sinónimos y los valores dN/dS significativamente por encima de 1.0 en los genes *dbpII*, *mSP142* y *ama1I-II* en parásitos de México y de los distintos sitios geográficos sugieren que estos genes están sometidos a selección natural positiva, presuntivamente por la exposición a la respuesta inmune en el torrente sanguíneo durante la liberación de los merozoítos y el proceso de invasión.

En general los genes que codifican para proteínas que participan en el proceso de invasión han mostrado un grado alto de diversidad genética principalmente en los segmentos que interaccionan con el eritrocito, como parte de un mecanismo de evasión del sistema inmune (VanBuskirk *et al.*, 2004; Cole-Tobian *et al.*, 2007; Gunasekera *et al.*, 2007; Putaporntip *et al.*, 2009). La distinta diversidad genética encontrada en *dbpII*, *mSP142* y *ama1I-II* puede estar determinada principalmente por la función en la que participan estas proteínas durante la invasión e inmunogenicidad. En parásitos de Sri Lanka se determinó selección natural balanceadora en el gen *ama1I-II* (Gunasekera *et al.*, 2007) asociada con la evasión de la respuesta inmune del hospedero. La proteína MSP142 es

abundante en la superficie del merozoíto y esta molécula es de primer contacto con el eritrocito susceptible (Holder *et al.*, 1999) y es capaz de inducir una fuerte respuesta de anticuerpos durante la infección primaria en la mayoría de las personas afectadas (Barbero *et al.*, 2007). Sin embargo, la inducción de una respuesta de anticuerpos contra AMA1_{I-II} (Barbero *et al.*, 2007; Haghi *et al.*, 2012) y DBP_{II} (Barbero *et al.*, 2007) requirió mayor exposición (número de infecciones) que para MSP1₄₂. DBP es liberada por los micronemas inmediatamente antes de la unión al Receptor Duffy del eritrocito por el mecanismo “justo a tiempo” (Singh *et al.*, 2006) e induce una respuesta inmune débil y de corta duración (Sousa *et al.*, 2010).

Los resultados de este estudio sugieren que la diversidad genética de *P. vivax* en el Sur de México es mantenida principalmente por selección natural positiva y eventos de recombinación. La presencia y magnitud de las infecciones mixtas en la región quizás favorece los eventos de recombinación entre genotipos distintos, en el Sur de México, para el periodo 1998-2005, se reportó una prevalencia de <10% de infecciones mixtas (Joy *et al.*, 2008). A nivel global los eventos de recombinación para *dbpII*, *ama1_{I-II}* y *msp1₄₂* fueron 16, 17 y 23 eventos mínimos, respectivamente. Estos eventos se visualizaron en los alineamientos de las secuencias de aminoácidos de estos genes con los respectivos para las cepas Sal I y Belem, algunos segmentos tienen fragmentos de estas dos secuencias. Los pocos eventos de recombinación en *dbpII* (n=1) y *ama1_{I-II}* (n=3) determinados en parásitos de México apoyan la suposición de que el grupo de parásitos estudiados aquí corresponde a la expansión de algunos genotipos al incrementarse la transmisión. Es también posible que *msp1₄₂* fue menos afectados por estos cambios en la transmisión. Los eventos de recombinación pueden ser altos incluso en zonas de baja transmisión como se mostró para el gen *ama1* de parásitos de Sri Lanka en donde los valores altos de desequilibrio de ligamiento (LD) y diversidad de haplotipos (HD) indican que los nuevos haplotipos generados son producto de la recombinación durante la meiosis y mitosis (Dias *et al.*, 2010; Thakur *et al.*, 2008; Gunasekera *et al.*, 2007). También se ha reportado que en parásitos de Sri Lanka (Gunasekera *et al.*, 2007), Myanmar (Moon *et al.*, 2010) y Venezuela (Ord *et al.*, 2008), en el gen *ama1* la recombinación es un mecanismo importante en la generación de diversidad. En la mayoría de los sitios geográficos, la recombinación parece ser un mecanismo importante para la generación de la diversidad parasitaria (Cuadro3, denotado por los valores C (valores mayores a 1.0)), a excepción en los parásitos de Brasil y Sri Lanka; Tailandia e India, donde *dbpII* y *ama1_{I-II}*, respectivamente presentaron valor menor de 1.0. En *P. vivax* de Tailandia e India también se encontró que *ama1* mostró un mayor número de haplotipos que de

mutaciones pero no para *dbpII* y *mSP1₄₂*. En países como Sri Lanka los eventos de recombinación en *MSP1₄₂* fueron mayores (Dias *et al.*, 2010) que en Corea del Sur (Kang *et al.*, 2012). Las diferencias en el grado de recombinación y mutación están posiblemente determinadas por la funcionalidad de cada molécula la presión inmunológica, la epidemiología, intensidad y dinámica de la transmisión.

Los índices de diferenciación genética (*Fst*) para *dbpII*, *mSP1₄₂* y *ama1_{I-II}* encontrados en este estudio sugieren que los *P. vivax* del Sur de México podría tratarse de una población única, distinta de la de otros sitios geográficos del mismo continente (Colombia y Brasil) y de otros continentes. Por otra parte, no se encontró asociación entre la distancia geográfica y el índice *Fst*, por ejemplo para *dbpII* México y Colombia/Brasil mostraron índices altos de *Fst*, este valor fue más bajo para México y Tailandia; para *ama1* el índice *Fst* más alto fue entre México y Venezuela Para DBP la mayoría de los haplotipos se han reportado en Brasil y en otros sitios geográficos indican la amplia distribución de la mayoría de los haplotipos aunque las proporciones varían. En general, los índices más bajos de *Fst* fueron para *ama1*. Estudios previos también indican que hay una baja diferenciación genética en *ama1* en el mundo (Grinberg *et al.*, 2008; Chenet *et al.*, 2012; Figtree *et al.*, 2000; Rodrigues *et al.*, 2005; Gunasekera *et al.*, 2007). En análisis de este gen en parásitos de Brasil sugirió una submuestra de Asia, consistente con una reciente y rápida expansión en la región con baja diversidad genética (Grynberg *et al.*, 2008) muy similar a lo encontrado en el Sur de México. Se ha sugerido que el grado de variación en *AMA1_{I-II}* en el mundo puede estar limitado por una fuerte restricción funcional (Mahajan *et al.*, 2005).

La detección de poblaciones de *P. vivax* con características genéticas únicas podría afectar la eficacia de las vacunas. A pesar de que en este estudio las sustituciones se observaron en sitios adyacentes a los sitios ligando en los tres genes, hay evidencia de que algunos polimorfismos reducen la eficacia de anticuerpos bloqueadores inducidos por el haplotipo de la cepa Sal I (Souza *et al.*, 2010). Además, se ha descrito que las sustituciones de aminoácidos hidrófilos puede afectar la inmunogenicidad del epítipo. En los aislados de México se identificaron sustituciones en varios epítipos B de la proteína DBP_{II} (H1, L3, H3, M2 y M3) y en una alta proporción (0.85) de los aislados se registraron cambios en los residuos de amino ácidos Asn 417 Lys (hidrófilo→ básico), Trp 437 Arg e Ile 503 Lys (hidrofóbico →básico) de los epítipos M2 y M3, cada sustitución o el conjunto están relacionados con la inhibición o reducción de anticuerpos bloqueadores inducidos por la secuencia Sal I (VanBurskik *et al.*, 2004). Los parásitos obtenidos durante el 2006-2007

representan la posible expansión de algunos genotipos prevalentes en los años 2004-2005. Con una muestra representativa se podría sugerir que estos haplotipos de *P. vivax* fueron más persistentes/resistentes a la reducción de la transmisión con posibles implicaciones biológicas.

Para AMA1_{I-II} los cambios se presentaron principalmente en el dominio I es identificado como parte del motivo de unión PAN (asociados a la adhesión) (Pizarro *et al.*, 2005). En Tailandia se identificó entre los dominios I y II un sitio de alta recombinación que formaban nuevos motivos de reconocimiento de anticuerpos. En este sitio, se encontró desequilibrio de ligamiento a pesar de que tres cambios de aminoácidos conforman un epítipo B (1F9) (Edmon *et al.*, 2007). Con el desarrollo de anticuerpos monoclonales se han identificado posibles epítipos B en AMA1_{I-II} (Gunasekera *et al.*, 2007). En los aislados de México aunque solo se presentó un cambio Ala141Glu (hidrofóbico→ácido) en los sitios adyacentes a un epítipo B configuracional donde participa el residuo 142, sería necesario investigar si este u otros cambios modifican la estructura terciaria de la molécula y afectan el reconocimiento por anticuerpos. En MSP1₄₂, en los aislados del Sur de México todos los polimorfismos se encontraron en el fragmento MSP1₃₃, este segmento es muy inmunogénico, además se detectó la sustitución de un aminoácido hidrófilico (Gly) a uno con carga negativa (Glu) en un epítipo de células T (Dias *et al.*, 2011) modificación que posiblemente afecte la interacción, pero su impacto en la producción de anticuerpos no ha sido determinado; el segmento MSP1₁₉ fue muy conservado.

Los tres genes para México resolvieron 16 haplotipos de *P. vivax* y permitieron determinar la diferencia en las frecuencias de estos haplotipos entre el 2006 y el 2007. En resumen este estudio contribuye a la epidemiología molecular de *P. vivax* a nivel global, con aplicación en la vigilancia parasitológica y en el diseño de vacunas basadas en antígenos de fases sanguíneas. Los estudios más extensivos en tiempo y espacio en la región mesoamericana permitirán describir los haplotipos circulantes, persistentes y causantes de brotes a nivel de micro región.

BIBLIOGRAFÍA

- Alexandre, M.A., Ferreira, C.O., Siqueira, A.M., Magalhães, B.L., Mourão, M.P., Lacerda, M.V., Alecrim, Md., 2010. Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 1611-1614.
- Ampudia, E., Patarroyo, M.A., Patarroyo, M.E., Murillo, L.A., 1996. Genetic polymorphism of the Duffy receptor binding domain of *Plasmodium vivax* in Colombian wild isolates. *Mol. Biochem. Parasitol.* 78, 269-272.
- Arévalo-Herrera, M., Chitnis, C., Herrera, S., 2010. Current status of *Plasmodium vivax* vaccine. *Hum. Vaccine* 6, 124-132.
- Arnott, A., Barry, A.E., Reeder, J.C., 2010. Understanding the population genetics of *Plasmodium vivax* is essential for malaria control and elimination. *Malar. J.* 10, 11-14.
- Babaeekho, L., Zakeri S., Djadid, N.D., 2009. Genetic mapping of the duffy binding protein (DBP) ligand domain of *Plasmodium vivax* from unstable malaria region in the Middle East. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80, 112-118.
- Barnwell, J.W., Wertheimer, S.P., 1989. *Plasmodium vivax*: merozoite antigens, the Duffy blood group, and erythrocyte invasion. *Prog. Clin. Biol. Res.* 313, 1-11. Review.
- Bastos, M.S., da Silva-Nunes, M., Malafrente, R.S., Hoffmann, E.H., Wunderlich, G., Moraes, S.L., Ferreira, M.U., 2007. Antigenic polymorphism and naturally acquired antibodies to *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in rural Amazonians. *Clin. Vaccine. Immunol.* 14, 1249-1259.
- Bonilla, J.A., Validum, L., Cummings, R., Palmer, C.J., 2006. Genetic diversity of *Plasmodium vivax* Pvcsp and Pvmsp1 in Guyana, South America. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75, 830-835.
- Chenet, S.M., Schneider, K.A., Villegas, L., Escalante, A.A., 2012. Local population structure of *Plasmodium*: impact on malaria control and elimination. *Malar. J.* 11, 412.
- Chootong, P., Ntumngia, F.B., VanBuskirk, K.M., Xainli, J., Cole-Tobian, J.L., Campbell, C.O., Fraser, T.S., King, C.L., Adams, J.H., 2010. Mapping epitopes of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein with naturally acquired inhibitory antibodies. *Infect. Immun.* 78, 1089-1095.

- Cole-Tobian, J.L., Michon, P., Dabod, E., Mueller I., King, C.L., 2007. Dynamics of asymptomatic *Plasmodium vivax* infections and Duffy binding protein polymorphisms in relation to parasitemia levels in Papua New Guinean children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77, 955-962.
- Cole-Tobian, J.L., Cortés, A., Baisor, M., Kastens, W., Xainli, J., Bockarie, M., Adams, J.H., King, C.L., 2002. Age-acquired immunity to a *Plasmodium vivax* invasion ligand, the duffy binding protein. *J. Infect. Dis.* 186, 531-539.
- Cui, L., Escalante, A.A., Imwong, M., Snounou, G., 2003. The genetic diversity of *Plasmodium vivax* populations. *Trends. Parasitol.* 19, 220-226. Review.
- Dias, S., Longacre, S., Escalante, A.A., Udagama-Randeniya, P.V., 2011. Genetic diversity and recombination at the C-terminal fragment of the merozoite surface protein-1 of *Plasmodium vivax* (PvMSP-1) in Sri Lanka. *Infect. Genet. Evol.* 11, 145-156.
- Dias, S., Somarathna, M., Manamperi, A., Escalante, A.A., Gunasekera, A.M., Udagama, P.V., 2011b. Evaluation of the genetic diversity of domain II of *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1 (PvAMA-1) and the ensuing strain-specific immune responses in patients from Sri Lanka. *Vaccine.* 6;29, 7491-7504.
- Edmond, J., Faber, B.W., Kocken, C.H., Thomas, A.W., 2008. Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review. *Trends. Parasitol.* 24, 74-84.
- Figtree, M., Pasay, C.J., Slade, R., Cheng, Q., Cloonan, N., Walker J., Saul A., 2000. *Plasmodium vivax* synonymous substitution frequencies, evolution and population structure deduced from diversity in AMA 1 and MSP 1 genes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 30, 53-66.
- González-Cerón, L., Mu, J., Santillán, F., Joy, D., Sandoval, M.A., Camas G., Su, X., Choy, E.V., Torreblanca, R., 2013. Molecular and epidemiological characterization of *Plasmodium vivax* recurrent infections in southern Mexico. *Parasit. Vectors.* 18,109.
- Gosi, P., Khusmith, S., Khalambaheti, T., Lanar, D.E., Schaecher, K.E., Fukuda, M.M., Miller, S.R., 2008. Polymorphism patterns in Duffy-binding protein among Thai *Plasmodium vivax* isolates. *Malar. J.* 7, 112.
- Grimberg, B.T., Udomsangpetch, R., Xainli, J., McHenry, A., Panichakul, T., Sattabongkot, J., Cui, L., Bockarie, M., Chitnis, C., Adams, J., Zimmerman, P.A., King, C.L., 2007. *Plasmodium vivax* invasion of human erythrocytes inhibited by antibodies directed against the Duffy binding

protein. PLoS Med. 4, 337.

- Guerra, C.A., Howes, R.E., Patil, A.P., Gething, P.W., Van Boeckel, T.P., Temperley, W.H., Kabaria, C.W., Tatem, A.J., Manh, B.H., Elyazar, I.R., Baird, J.K., Snow, R.W., Hay, S.I., 2010. The international limits and population at risk of *Plasmodium vivax* transmission in 2009. PLoS Negl. Trop. Dis. 3, 774.
- Gunasekera, A.M., Wickramarachchi, T., Neafsey, D.E., Ganguli, I., Perera, L., Premaratne, P.H., Hartl, D., Handunnetti, S.M., Udagama-Randeniya, P.V., Wirth, D.F., 2007. Genetic diversity and selection at the *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1 (PvAMA-1) locus in a Sri Lankan population. Mol. Biol. Evol. 24, 939-947.
- Haghi, A.M., Khoramizade, M.R., Nateghpour, M., Mohebbali, M., Edrissian, G.H., Eshraghian, M.R., Sepehrizadeh, Z., 2012. A recombinant *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1 to detect human infection in Iran. Korean. J. Parasitol. 50, 15-21.
- Hans, D., Pattnaik, P., Bhattacharyya, A., Shakri, A.R., Yazdani, S.S., Sharma, M., Choe, H., Farzan, M., Chitnis, C.E., 2005. Mapping binding residues in the *Plasmodium vivax* domain that binds Duffy antigen during red cell invasion. Mol. Microbiol. 55, 1423-1434
- Holder, A.A., Guevara-Patiño, J.A., Uthaipibull, C., Syed, S.E., Ling, I.T., Scott-Finnigan, T., Blackman, M.J., 1999. Merozoite surface protein 1, immune evasion, and vaccines against asexual blood stage malaria. Parasitologia. 41, 409-414 Review.
- Iyer, J., Grüner, A.C., Rénia, L., Snounou, G., Preiser, P.R., 2007. Invasion of host cells by malaria parasites: a tale of two protein families. Mol. Microbiol. 65, 231-249. Review.
- Joy, D.A., González-Cerón, L., Carlton, J.M., Gueye, A., Fay, M., McCutchan, T.F., Su, XZ., 2008. Local adaptation and vector-mediated population structure in *Plasmodium vivax* malaria. Mol. Biol. Evol. 25, 1245-1252.
- Kang, J.M., Ju, H.L., Kang, Y.M., Lee, D.H., Moon, S.U., Sohn, W.M., Park, J.W., Kim, T.S., Na, B.K., 2012. Genetic polymorphism and natural selection in the C-terminal 42 kDa region of merozoite surface protein-1 among *Plasmodium vivax* Korean isolates. Malar. J. 18, 206.
- Kim, S.H., Hwang, S.Y., Lee, Y.S., Choi, I.H., Park, S.G., Kho W.G., 2007. Single-chain antibody fragment specific for *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. Clin Vaccine Immunol. 14(6):726-31.

- Kho, W.G., Chung, J.Y., Sim, E.J., Kim, D.W., Chung, W.C., 2001. Analysis of polymorphic regions of *Plasmodium vivax* Duffy binding protein of Korean isolates. Korean J. Parasitol. 39,143-150.
- Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNAPolymorphism data. Bioinformatics 1, 1451-1452.
- Mahajan, R.C., Farooq, U., Dubey, M.L., Malla, N., 2005. Genetic polymorphism in *Plasmodium falciparum* vaccine candidate antigens. Indian. J. Pathol. Microbiol. 48, 429-438. Review.
- Martinez, P., Suarez, C.F., Cardenas, P.P., Patarroyo, M.A., 2004., *Plasmodium vivax* Duffy binding protein: a modular evolutionary proposal. Parasitology. 128, 353-366.
- Mendis, K., Sina, B.J., Marchesini, P., Carter, R., 2001.The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. Am. J. Trop. Med. Hyg. 64, 97-106. Review.
- Moon, S.U., Na, B.K., Kang, J.M., Kim, J.Y., Cho, S.H., Park, Y.K., Sohn, W.M., Lin, K., Kim, T.S., 2010. Genetic polymorphism and effect of natural selection at domain I of apical membrane antigen-1 (AMA-1) in *Plasmodium vivax* isolates from Myanmar. Acta Trop. 114, 71-75.
- Múfalo, B.C., Gentil, F., Bargieri, D.Y., Costa, F.T., Rodrigues, M.M., Soares, I.S., 2008. *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1: comparative recognition of different domains by antibodies induced during natural human infection. Microbes Infect. 10, 1266-1273.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2010, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector.
- PAHO –report. 2011, Informe de la situación del paludismo en la región de las Américas. http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=2459%3Areport-on-the-situation-of-malaria-in-the-americas-2008&catid=1617%3Ahsd0107g-malaria-statistics-and-maps&Itemid=2049&lang=es (última fecha de acceso: Septiembre 22, 2013).
- Pizarro, J.C., Vulliez-Le Normand, B., Chesne-Seck, M.L., Collins, C.R., Withers-Martinez, C., Hackett, F., Blackman, M.J., Faber B.W., Remarque, E.J., Kocken, C.H., Thomas, A.W., Bentley G.A., 2005. Crystal structure of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1. Science 15, 408-411.

- Premaratne, P.H., Aravinda, B.R., Escalante, A.A., Udagama, P.V., 2011. Genetic diversity of *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein II (PvDBPII) under unstable transmission and low intensity malaria in Sri Lanka. *Infect Genet. Evol.* 11, 327-339.
- Price, R.N., Tjitra, E., Guerra, C.A., Yeung, S., White, N.J., Anstey, N.M., 2007. Vivax malaria: neglected and not benign. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77, 79-87. Review.
- Putaporntip, C., Jongwutiwes, S., Sakihama, N., Ferreira, M.U., Kho, W.G., Kaneko, A., Kanbara, H., Hattori, T., Tanabe, K., 2002. Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 10 16348-16353.
- Putaporntip, C., Jongwutiwes, S., Grynberg, P., Cui, L., Hughes, A.L., 2009. Nucleotide sequence polymorphism at the apical membrane antigen-1 locus reveals population history of *Plasmodium vivax* in Thailand. *Infect. Genet. Evol.* 9, 1295-1300.
- Ranjan, A., Chitnis, C.E., 1999. Mapping regions containing binding residues within functional domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* erythrocyte-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 23, 14067-14072.
- Rodrigues, M.H., Rodrigues, K.M., Oliveira, T.R., Cômodo, A.N., Rodrigues, M.M., Kocken, C.H., Thomas, A.W., Soares, I.S., 2005. Antibody response of naturally infected individuals to recombinant *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1. *Int. J. Parasitol.* 35, 185-192.
- Rodríguez, M.H., Betanzos-Reyes, A.F., Grupo de Trabajo de Malaria del Sistema Mesoamericano de Salud Pública, 2011. Plan de mejoramiento del control de la malaria hacia su eliminación en Mesoamérica. *Salud Pública de México* 53, S333- S348.
- Singh, N., Chand, S.K., Mishra, A.K., Bharti, P.K., Singh, M.P., Ahluwalia, T.P., Dash, A.P., Epidemiology of malaria in an area of low transmission in central India. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75, 812-816.
- Sousa, T.N., Tarazona-Santos, E.M., Wilson, D.J., Madureira, A.P., Falcão, P.R., Fontes, C.J., Gil, L.H., Ferreira, M.U., Carvalho, L.H., Brito, C.F., 2010. Genetic variability and natural selection at the ligand domain of the Duffy binding protein in Brazilian *Plasmodium vivax* populations. *Malar. J.* 22, 334.

- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731-2739.
- Thakur, A., Alam, M.T., Sharma, Y.D., 2008. Genetic diversity in the C-terminal 42 kDa region of merozoite surface protein-1 of *Plasmodium vivax* (PvMSP-1(42)) among Indian isolates. *Acta Trop.* 108, 58-63.
- Tsuboi, T., Kappe, S.H., al-Yaman, F., Prickett, M.D., Alpers, M., Adams, J.H., 1994. Natural variation within the principal adhesion domain of the *Plasmodium vivax* duffy binding protein. *Infect Immun.* 62, 5581-5586.
- VanBuskirk, K.M., Sevova, E., Adams, J.H., 2004a. Conserved residues in the *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein ligand domain are critical for erythrocyte receptor recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2, 15754-15759.
- VanBuskirk, K.M., Cole-Tobian, J.L., Baisor, M., Sevova, E.S., Bockarie, M., King, C.L., Adams J.H., 2004b. Antigenic drift in the ligand domain of *Plasmodium vivax* duffy binding protein confers resistance to inhibitory antibodies. *J. Infect. Dis.* 1;190, 1556-1562.
- Xainli, J., Adams, J.H., King, C.L., 2000. The erythrocyte binding motif of *Plasmodium vivax* duffy binding protein is highly polymorphic and functionally conserved in isolates from Papua New Guinea. *Mol. Biochem. Parasitol.* 111, 253-260.
- Zeyrek, F.Y., Babaoglu, A., Demirel, S., Erdogan, D.D., Ak, M., Korkmaz, M., Coban, C., 2008. Analysis of naturally acquired antibody responses to the 19-kd C-terminal region of merozoite surface protein-1 of *Plasmodium vivax* from individuals in Sanliurfa, Turkey. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78, 729-732.
- World Health Organization. World Malaria report. 2012, http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/report/en/index.html

Anexo 1. Haplotipos de las proteínas DBP_{II} MSP1₄₂AMA1_{I-II} para los aislados *P. vivax* del Sur de México

fecha de toma muestra	Código muestra	proteínas del merozoíto			Haplotipo combinado
		DBP _{II}	MSP1 ₄₂	AMA1 _{I-II}	
10/01/06	GA1	IIa	Ia	IIa	C
19/01/06	MG	IIb	II	I	H
14/02/06	TO	IIa	II	I	F
11/03/06	GA2	I	II	III	E
23/03/06	TA2	I	Ia	V	B
06/04/06	SR	I	II	III	E
12/04/06	CE	I	Ic	I	O
04/05/06	FB	I	III	IIa	I
27/05/06	TA3	IIc	IVb	IIa	P
01/06/06	VI1	I	III	IIa	I
14/06/06	TA4	I	III	IIa	I
26/08/06	HU	Vb	Id	VI	N
11/09/06	CN	III	Ib	-	-
28/10/06	CB	Va	Ib	IV	K
15/11/06	TA5	IV	V	IIb	L
21/11/06	UR	IIa	II	I	F
17/12/06	ZA	IIa	II	III	G
06/01/07	GA3	I	Ia	I	A
11/01/07	CA	I	II	III	E
12/01/07	MR	I	IVa	IIa	M
21/01/07	VI2	I	Ia	I	A
27/02/07	RE1	I	Ia	I	A
26/03/07	RE2	I	Ia	I	A
26/04/07	CH	III	Ib	IV	J
07/05/07	GU	I	Ia	I	A
22/05/07	LA	I	II	I	D
30/05/07	PR	I	III	IIa	I
01/06/07	TA1	I	Ia	I	A
10/06/07	NV	I	IVa	IIa	M
28/06/07	TA6	I	Ia	I	A
03/07/07	TA7	I	-	I	-
07/07/07	TA8	I	Ia	I	A
15/09/07	TA9	I	Ia	I	A
21/09/07	TA10	I	Ia	I	A
06/11/07	TL	IIa	Ia	IIa	C

Anexo 2a. Frecuencia de polimorfismos en la proteína DBP_{II} por región geográfica.

Residuo AA	Frecuencia (%)										
	MX	IRN	MYA	CS	PNG	TL	BR	IND	CL	SLK	MUNDIAL
308 Arg/Ser	17	0	22	0	69	23	7	3	0	13	23
371 Glu/Lys	20	19	22	50	12	20	26	35	22	33	26
384 Gly/Asp	31	56	85	86	66	73	82	85	61	94	76
385 Glu/Lys	51	0	33	2	10	43	20	25	22	20	17
386 Lys/Asn	17	0	33	3	10	37	22	25	22	20	16
386 Lys/Gln	0	0	4	1	16	3	5	6	0	0	6
390 Arg/His	9	37	63	85	5	53	50	62	6	67	44
417 Asn/Lys*	89	47	39	64	31	40	40	40	44	35	43
424 Leu/Ile	89	47	83	100	68	83	47	41	44	48	64
437 Trp/Arg*	86	49	61	64	31	63	49	40	17	36	46
503 Ile/Lys*	91	76	78	64	39	57	43	61	11	56	55

Cepa de referencia: Sal I (XM_001608337) *Participan en la inhibición del bloqueo de invasión por anticuerpos (VanBuskirk KM *et al.*, 2004). MX, México; IRN, Irán; MYA, Myanmar; CS, Corea del Sur; TL, Tailandia; BR, Brasil; IND, India; CL, Colombia; SLK, Sri Lanka.

Anexo 2b. Frecuencia de polimorfismos de AMA1_{I-II} por región geográfica.

Residuo AA	Frecuencia (%)						
	MX	VNZ	SLK	TL	IND	IRN	MUNDIAL
130 Asn/Lys	29	21	0	10	8	17	13
132 Asn/Asp	29	21	4	12	53	67	21
140 Leu/Ile	53	51	78	78	42	50	66
141 Ala/Glu	47	41	13	13	20	17	22
145 Glu/Ala	100	67	100	92	73	67	86
189 Glu/Asn	26	0	0	13	12	17	11
189 Glu/Lys	18	29	26	38	40	17	34
190 Lys/Gln	15	4	0	9	0	0	7
190 Lys/Glu	0	0	13	34	20	17	22
227 Glu/Val	50	0	30	23	38	33	24
227 Glu/Lys	0	0	0	13	0	0	7
228 Ser/Asp	50	0	30	23	38	33	24
277 Glu/Lys	100	100	61	89	82	83	89
352 Lys/Asn	44	16	17	21	5	17	20
352 Lys/Glu	0	0	9	3	8	17	4
368 Lys/Ile	53	18	48	1	12	17	12
380 Leu/Pro	53	58	30	30	45	67	39
384 Leu/Arg	0	0	30	54	25	0	34

Cepas de referencia: Sal I (XM_001615397). MX, México; VNZ, Venezuela; SLK, Sri Lanka, TL, Tailandia; IND, India; IRN, Irán.

Anexo 2c. Frecuencia de polimorfismos de MSP₄₂ por región geográfica.

Residuo AA	Frecuencia (%)									
	MX	TQ	CS	SNG	BG	TL	BR	IND	SLK	MUNDIAL
1454 Ile/Leu	88	100	80	0	0	9	82	41	42	53
1466 Met/Lys	100	100	84	38	0	29	91	72	84	71
1476 Thr/Ala	68	100	100	34	100	57	82	72	63	76
1482 Gly/Glu*	26	27	82	10	40	42	64	62	41	53
1490 Asp/Thr	35	27	82	6	80	32	64	48	46	52
1491 Gly/Ala	35	27	82	8	80	32	64	52	46	52
1493 Lys/Asn	35	27	84	8	80	32	64	52	47	53
1494 Thr/Glu	12	0	66	6	80	13	9	31	21	33
1494 Thr/Ala	24	27	18	4	0	19	55	21	26	20
1495 Glu/Gln	26	27	18	2	0	19	55	21	25	20
1496 Ile/Val	12	0	66	6	80	13	9	31	22	34
1501 Asp/Ala	12	0	66	50	80	26	18	31	22	40
1505 Lys/Ala	12	0	66	50	60	27	9	24	20	39
1505 Lys/Thr	56	90	35	30	40	25	45	45	41	39
1506 Gln/Glu	15	0	66	50	0	27	27	24	20	39
1506 Gln/His	59	90	17	28	20	10	18	10	15	22
1508 Glu/Asp	12	0	66	50	60	27	9	24	22	39
1509 Glu/Lys	65	90	82	78	80	37	27	34	35	61
1510 Lys/Ile	12	0	66	50	60	27	9	24	22	39
1511 Lys/Gln	56	90	17	30	20	10	18	10	13	22
1513 Lys/Ile	35	0	84	52	80	51	64	59	48	59
1514 Gly/Glu	24	0	37	8	20	38	64	21	30	30
1515 Asn/Ser	68	90	64	72	80	27	18	45	39	53
1516 Val/Gly	21	10	0	20	0	32	18	17	35	17
1516 Asn/Val	88	100	53	56	40	68	91	72	80	67
1517 Asn/Ser	12	0	47	44	60	29	9	28	19	32
1517 Asn/Ala	24	0	37	8	20	22	55	31	28	27
1517 Asn/Val	53	90	17	28	20	14	18	24	20	24
1518 Ser/Thr	12	0	47	44	60	29	9	21	20	32
1518 Ser/Asn	24	0	37	8	20	22	55	31	27	27
1519 Gln/Lys	35	0	84	52	80	51	64	52	47	59
1520 Asp/Thr	35	0	65	46	80	37	55	48	45	49
1520 Asp/Asn	56	90	17	28	20	14	18	24	19	24
1521 Ser/Thr	12	0	47	44	60	29	9	21	21	32
1521 Ser/Ala	24	0	37	8	20	22	55	31	27	27
1522 Lys/Glu	91	87	100	80	100	65	82	86	64	83
1524 Asn/Ala	26	0	18	2	20	24	55	28	25	20
1524 Asn/Thr	65	90	82	78	80	41	27	55	42	64
1525 Glu/Lys	24	0	18	2	20	24	55	28	25	20
1525 Glu/Gln	68	90	82	78	80	41	27	55	42	64
1526 Phe/Ser	12	0	66	52	60	28	9	28	22	40
1526 Phe/Leu	56	90	17	26	20	13	18	28	19	24
1527 Ile/Met	12	0	66	52	60	28	9	24	22	40
1527 Ile/Thr	24	0	18	2	20	24	55	28	25	20
1527 Ile/Asn	56	90	17	26	20	13	18	24	18	24
1625 Lys/Glu	3	0	0	0	0	0	0	0	0	<1

Cepas de referencia: *Sal I (XM_001614792). YNKMGE LYK Predicción de epitopos T (Dias *et al.*, 2011).

MX, México; TQ, Turquía; CS, Corea del Sur; SNG, Singapur; BG, Bangladesh; TL, Tailandia; BR, Brasil; IND, India; SLK: Sri Lanka