

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA
CENTRO REGIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA DE CONCENTRACIÓN EN ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR VECTOR

TESIS

**Evaluación de la diversidad genética de la proteína circunsporozoítica de
Plasmodium vivax, en distintos focos de transmisión de México**

**Requisito parcial para optar por el grado de
Maestro en ciencias de la Salud con área de concentración en
enfermedades transmitidas por vector**

PRESENTA:

QFB. Delfino de Jesús Gómez Pérez

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Lilia González Cerón

Asesores:

Dr. René Cerritos Flores

Dr. Jesús Martínez Barnetche

TAPACHULA, CHIAPAS

AGOSTO DE 2014

Diversidad genética de la proteína circunesporozoítica de *Plasmodium vivax* en distintos focos de transmisión 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:

QFB. Delfino de Jesús Gómez Pérez

Agosto de 2014

Este trabajo se realizó en el laboratorio de inmunoparasitología molecular del Centro Regional de Investigación en Salud Pública, como parte del proyecto CONACy- México: CB-2009-01-131247 “Estudio molecular de los parasitos de *Plasmodium vivax* que persisten en México y Nicaragua” bajo responsabilidad de la Dra. Lilia González Cerón

Dedicatorias

A Dios, quién supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban.

A mis padres, Mariano y Lucia, con todo mi cariño y mi amor ya que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme a seguir adelante siempre.

A mis hermanos, Ade, Frida, Herí, Juan por ser parte esencial en mi vida, en especial a mi hermana Consuelo porque siempre confió en mi y nunca ha dejado de apoyarme.

AGRADECIMIENTOS:

A la **Dra. Lilia González Cerón** por darme la oportunidad de realizar esta tesis bajo su dirección, por compartirme sus conocimientos, tiempo, experiencia, paciencia y consejos durante la elaboración de la tesis.

Al personal del laboratorio de inmunoparasitología molecular del CRISP:

QFB. Frida Santillán por el apoyo y contribuciones en el procesamiento de muestras por PCR-RFLP y la revisión de secuencias obtenidas durante proceso experimental de la tesis, por compartirme sus conocimientos y experiencia en el laboratorio

QFB Marco Alessio Sandoval por su apoyo en el laboratorio, así como su enseñanza en la elaboración de mapas.

MC. Rafael Avendaño, por su apoyo en el procesamiento de muestras por PCR-RFLP y enseñanzas de laboratorio.

QFB. Olga Lidia Palomeque por su apoyo y enseñanza en la extracción de ADN.

Al Dr. René Cerritos Flores por sus comentarios y aportaciones durante la revisión de la tesis.

Al Dr. Jesús Martínez Barnetche por sus comentarios durante la revisión de la tesis.

Al Dr. Mario H. Rodríguez por sus comentarios y sugerencias en la revisión de la tesis

A mis compañeros Sleidher Gutiérrez, Oscar Carmona, Luis Cisneros por su amistad, apoyo y consejos durante toda la maestría y en el desarrollo de la tesis.

Al CONACyT por el apoyo económico que me brindo para realizar mis estudios de maestría.

CONTENIDO

Resumen	1
Introducción	3
Metodología	5
Obtención de las muestras	5
Extracción de ADN de laminillas con gota gruesa y extendido sanguíneo	5
Amplificación del gen de la proteína circunesporozoítica (<i>csp</i>)	5
Determinación del genotipo PCR-RFLP	6
Obtención de las secuencias nucleotídicas del segmento variable	7
Análisis de los resultados	7
Análisis de distribución mismatch	9
RESULTADOS	9
Amplificación del gen <i>csp</i>	9
Genotipos y variantes PCR-RFLP	10
Distribución geográfica de los genotipos de la CSP de <i>P. vivax</i>	10
Polimorfismo de la secuencia nucleotídica	15
Distribución mismatch	17
DISCUSIÓN	19
BIBLIOGRAFÍA	23
ANEXOS	28

RESUMEN

Antecedentes: En México, el paludismo es causado por *Plasmodium vivax* y se limita a unos pocos focos residuales de transmisión. El análisis de polimorfismo molecular y estudios de epidemiología molecular contribuyen a comprender cambios en la dinámica de la transmisión de *P. vivax* y son útiles para la vigilancia epidemiológica del parásito. La proteína circunsporozoítica (CSP) es un importante candidato para la producción de vacunas y se ha utilizado como marcador epidemiológico relevante. Existen dos genotipos vk210 y vk247 que se distinguen por diferencias de la secuencia de aminoácidos de su segmento central repetido (RCR), y se encuentran ampliamente distribuidos en las zonas afectadas. En el Sur de México, se ha reportado la presencia de ambos genotipos y se han asociado parcialmente a la susceptibilidad de los vectores locales. Por la similitud de su secuencia nucleotídica, se han identificado parásitos relacionados con los encontrados en América y Asia. En este trabajo, se analizó el polimorfismo del gen de la proteína CSP en los focos residuales de transmisión en la costa del Océano Pacífico y la Selva Lacandona, México

Metodología: Las muestras se obtuvieron del extendido sanguíneo teñido y fijado con metanol en laminillas diagnosticadas con *P. vivax* de cuatro focos con transmisión (F1, Chihuahua-Sinaloa; F2, Durango-Nayarit-Jalisco; F3, Pochutla, Oaxaca; F4, Palenque-Ocosingo, Chiapas) en el período 2010-2012. Después de la extracción del ADN, se utilizaron oligonucleótidos específicos para amplificar el segmento variable de la CSP por reacciones de PCR, seguido de análisis de restricción por RFLP. Se determinó la frecuencia de genotipos por PCR-RFLP y foco de transmisión. Grupos de muestras con distinto PCR-RFLP se secuenciaron por Sanger. Con la secuencia de nucleótidos se analizaron las similitudes de la región carboxilo y por distribución mismatch de la RCR en comparación con secuencias de parásitos del Sur de México y otras zonas afectadas del mundo.

Resultados: Se logró amplificar y obtener el genotipo PCR-RFLP del gen de la CSP en 183 de 335 muestras; 82% fueron vk247 y el 32% fueron vk210; tres variantes vk247 (I, II, III) y cinco variantes vk210 (*a, b, d, g y h*). Con ambos genotipos; F1 (vk247-I, vk210*a/h*), F2 (vk247-I/III, vk210*a*) y en el F3 sólo se detectó vk247-I. La variante vk247 fue encontrada en alta frecuencia en los cuatro focos de transmisión, aunque en F4 hubo mayor diversidad, ambos genotipos se encontraron en frecuencias similares (vk247-I/II, vk210*a, b*,

d, g). Los genotipos más frecuentes (vk210*a, b, d* y vk247-I) fueron similares a los reportados anteriormente en el Sur de México. Los genotipos nuevos corresponden al vk247-II, detectada en Chiapas en el 2012 y el vk247-III fue detectado en Nayarit en el 2011, ambas fueron similares a vk247-I. Mientras, el genotipo vk210*h* detectado en el estado de Chihuahua en el 2010, tuvo 17 unidades repetidas en la RCR y dos copias del dominio ANKKAEDA en la región carboxilo. La similitud de la región carboxilo y los parámetros de la distribución mismatch de la RCR agrupan a los parásitos vk210 *b, d, h* con los de encontrados en regiones fuera de América.

Conclusión: El limitado número de variantes y las similitudes entre los vk247-I, -II y -III; así como entre los vk210*b, d* y *h*, sugieren que es necesario investigar si corresponden a genotipos residuales de un pool génico más diverso. El genotipo vk247-I es el más frecuente en el Pacífico de México *An. pseudopunctipennis* se sugiere como el probable vector. Mientras en la Selva Lacandona la presencia de varios genotipos concuerda con la mayor complejidad epidemiológica, intensidad de transmisión, presencia de distintas especies vectores y ruta migratoria de las poblaciones humanas. Estos resultados con los encontrados en el Sur de México contribuyen a comprender mejor la epidemiología molecular de *P. vivax* en la región.

Palabras clave: *Plasmodium vivax*, México, foco de transmisión, proteína circunsporozoítica, polimorfismo genético, genotipo, PCR-RFLP, región central repetida, distribución mismatch, región carboxilo variable, árbol filogenético.

INTRODUCCION

El paludismo es una enfermedad parasitaria que afecta las regiones tropicales y subtropicales del mundo y se considera un problema de salud pública mundial (Chenet et al., 2012). Es transmitido por la picadura de mosquitos hembra del género *Anopheles* y actualmente se conocen cinco especies de *Plasmodium* que infectan al ser humano (OMS, 2013). En el mundo, aproximadamente 3,000 millones de personas en 100 países, están en riesgo de contraer una infección por cualquiera de las especies de *Plasmodium*. En 2010 la Organización Mundial de la Salud (OMS), estimó que hubo cerca de 219 millones de casos de paludismo y aproximadamente 660 mil muertes a nivel global (OMS, 2013). Aunque *P. falciparum* es el agente etiológico más virulento y mortal, *P. vivax* causa alta morbilidad y se encuentra distribuido ampliamente en todo el mundo. Los casos de infección por *P. vivax* se concentran principalmente en el Sureste de Asia, con un 52% del total mundial, la región este del Mediterráneo aporta un 15% y América del Sur un 13% (Guerra et al., 2006).

En las Américas 21 países son endémicos de paludismo y *P. vivax* es el principal agente etiológico. En México, 16.66% de la población se encuentra en riesgo de contraer infección de paludismo (Betanzos-Reyes, 2011). En la última década, el número de casos han disminuido de forma gradual; en el año 2000 se reportaron 7,390 y en el 2011 se reportaron solo 1,124. Actualmente, la transmisión en México se encuentra focalizada y el país se encuentra en etapa de pre-eliminación de la enfermedad (PAHO, 2011; WHO, 2012).

El conocimiento de las variantes del parásito que circulan en una región específica ayuda a describir en mayor detalle la dinámica de la transmisión, el diseño de vacunas en el caso de genes de respuesta inmune y el desarrollo de metodologías de vigilancia epidemiológica que servirán para monitorear la eliminación de la enfermedad, determinando parásitos causantes de brotes o parásitos introducidos en las zonas con transmisión (Chenet et al., 2012; Arnott et al., 2012). La proteína circunsporozoítica (CSP) de *Plasmodium*, una proteína que recubre al esporozoíto (fase infectante para el humano), tiene una importante función en la invasión de las glándulas salivales del mosquito y los hepatocitos de humanos (Coppi et al., 2011). Se le ha considerado como un importante

candidato para ser incluido en vacunas y por ello se ha evaluado las variaciones génicas y antigénicas en distintos países endémicos, dicha información es muy útil en la vigilancia epidemiológica (Arnott et al., 2012).

El gen que codifica para la CSP consta de una región central con repeticiones en tándem (RCR) de aminoácidos, y dos regiones muy conservadas I y II en las regiones amino y carboxilo terminal, respectivamente. En *P. vivax*, se han descrito dos principales genotipos de la CSP de acuerdo al tipo aminoácidos que conforman el unidad repetida: vk210 [GDRA (A/D) GQPA] (Arnott et al., 1985) y vk247 [ANGA (G/D) (N/D) QPG] (Rosenberg et al., 1993).

En el Sur de México se ha reportado la presencia de ambos genotipos de CSP vk210 y vk247 (Kain et al., 1992). También se ha reportado la mayor infectividad del genotipo vk247 para *Anopheles pseudopunctipennis* y la infectividad del genotipo vk210 para *Anopheles albimanus* y *Anopheles pseudopuntipennis* (González- Cerón et al., 1999, 2010). Un estudio molecular, mostró que el genotipo vk210 comprende una mayor diversidad, con cuatro variantes identificadas por PCR-RFLP (a^I , a^{II} , b , c , d). El análisis de la secuencia de la región carboxilo variable mostró que la variante vk210a fue similar a parásitos reportados en América, mientras que los vk210b, c y d son similares a parásitos Asiáticos (González-Cerón et al., 2013). En la fase de pre-eliminación, conocer los genotipos que circulan y sus características biológicas es información indispensable para la vigilancia epidemiológica molecular.

El principal objetivo del presente estudio fue identificar y analizar los genotipos de la CSP que circulan en los sitios con transmisión residual en México y su similitud con los previamente reportados para el Sureste del país y otras regiones geográficas. Para esto, *P.vivax* de los focos de transmisión de fronteras entre los estados de Sinaloa- Chihuahua, las fronteras entre Nayarit-Jalisco- Durango; Pochutla, Oaxaca; Palenque y Ocosingo, Chiapas y se analizaron por PCR-RFLP y secuenciación del gen *csp*.

METODOLOGÍA

Obtención de las muestras

La toma de muestra de sangre en gota gruesa y extendida en laminillas, la fijación con metanol y tinción con colorante Giemsa, así como su diagnóstico, se realizó por personal de la secretaria de salud (SSA) de los municipios y estados afectados, como parte de sus actividades de vigilancia del paludismo. Como parte del control de calidad, todas las laminillas positivas a *P. vivax* y un porcentaje de las negativas fueron revisadas por el laboratorio de paludismo del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE). Entonces, se seleccionaron un grupo de laminillas positivas a *P. vivax* de los cuatro focos de transmisión de paludismo en México de los años 2010, 2011 y 2012: F1) foco de transmisión que se conforma por las fronteras entre Chihuahua-Sinaloa, F2) las fronteras de Nayarit -Jalisco-Durango, F3) el municipio Pochutla, Oaxaca, F4) Ocosingo y Palenque, Chiapas.

Extracción de ADN de laminillas con gota gruesa y extendido sanguíneo.

En el laboratorio de paludismo del INDRE, de cada laminilla el extendido sanguíneo se raspó con una navaja, el material raspado se depositó en tubos de 1.5 ml y se les agregó 180 µl de PBS estéril (filtrado 0.2 µm). Las muestras fueron transportadas al laboratorio de inmunoparasitología molecular del Centro Regional de Investigación en Salud Pública (CRISP), del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP). Se preparó una base de datos, identificando a las muestras con una clave, el estado de procedencia y año de toma de muestra. La extracción de ADN se realizó con el kit comercial QIAmp DNA blood Minikit (Quiagen, CA, USA), siguiendo las instrucciones de fabricante. De cada muestra se obtuvieron 50 µl, el ADN total disuelto en agua se guardó a -20°C hasta su uso.

Amplificación por reacción en cadena de polimerasa (PCR) del gen de la proteína circunsporozoítica (csp).

Para obtener el fragmento que contiene la región central repetida (RCR) y el extremo terminal 3' variable, se llevaron a cabo las reacciones de amplificación mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) anidada previamente estandarizada (González-Cerón, *et al.* 2013) (Fig.1).



Figura 1. Se muestra la estructura primaria de la proteína circunsporozoítica y la ubicación de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del fragmento del gen de la CSP. Oligonucleótidos externos (CSP1 Y CSP2) y oligonucleótidos internos (PVRI, PV9a)

Determinación del genotipo PCR-RFLP

Para obtener el fragmento de interés, la primera amplificación por PCR, se usaron los oligonucleótidos CSP1 (5'-CGC ACT GCG GGC ACA ATG TAG ATC-3') y CSP2 (5'-GGT TAC ACT GCA TGG AGT CC-3') (González-Cerón et al., 2013). La mezcla de reacción se preparó a un volumen final de 20 μ l, agregando 4 μ l Buffer GoTaq Flexi 5X, 0.4 μ l de cada oligonucleótido (10 mM), 1.6 μ l de $MgCl_2$ (25 mM), 1 μ l de dNTPs (1.25 mM) (Invitrogen ,10297018 Carlsbad, CA, USA), 0.4 μ l de GoTaq Flexi ADN polimerasa (5U) (Promega madison, WI, USA), 8.35 μ l de agua grado biología molecular y 2 μ l de ADN. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: un ciclo inicial de 95°C por 3 minutos, seguido de 34 ciclos: 95°C por 30 segundos, 57°C por 40 segundos y 72°C por 1.5 minutos y un ciclo final de 72° por 10 minutos. Para la amplificación anidada, se usaron los oligonucleótidos PvR1 (5'-CCA GAT CAC GAG GAA GGA GAT-3') y Pv9a (5'-GCC AAC GGT AGC TCT AAC TTT-3') (González-Cerón et al., 2013), la mezcla de reacción se preparó a un volumen final de 60 μ l agregando 12 μ l de Buffer 5X, 1.2 μ l de cada oligonucleótido (10 mM), 4.8 μ l $MgCl_2$ (25 mM), 3 μ l de dNTPs (1.25 mM), 0.5 μ l GoTaq Flexi ADN polimerasa (5U) 34.9 μ l de agua grado molecular y 2.4 μ l del producto de la primer producto de PCR. Las condiciones fueron las siguientes: un ciclo inicial 95°C por 3 minutos, seguido de 34 ciclos: 95°C por 30 segundos, 57°C por 40 segundos y 72°C por 1.5 minutos, y un ciclo final 72°C por 10 min. Las reacciones de amplificación se efectuaron en un termociclador MyCycler (BioRad Hercules CA, USA).

Para el análisis de restricción RFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción), los productos de PCR se sometieron a digestión por separado con las enzimas *AluI* (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) que reconoce y corta a la secuencia AGCT de la región central repetida de vk210. La mezcla de reacción se preparó a un volumen final de 25 μ l, agregando 3 μ l de buffer NE 10X, 0.5 μ l de la enzima *AluI* (10U/ μ l), 1.5 μ l de agua grado molecular y 20 μ l del producto de PCR, la mezcla se incubó a 37° C durante 5 horas. La otra digestión fue con la enzima *Bst OI* (Promega, Madison, WI, USA) que reconoce y corta a la secuencia CCAGG de la región central repetida del genotipo vk247. La mezcla de reacción se preparó a un volumen final de 25 μ l, agregando 3 μ l de buffer C 10X, 0.25 μ l BSA acetilada 10 (μ g/ μ l), 0.5 μ l de la enzima *Bst OI* (10U/ μ l), 1.25 μ l de agua grado molecular y 20 μ l del producto de PCR, la mezcla se incubó a 56°C durante 5 horas. Los fragmentos de ADN se examinaron en un gel de agarosa al 1,5% con un transluminador de luz ultravioleta (UV) y se fotografiaron en un sistema de foto-documentación TM digital (UVP Inc., Upland, California).

Obtención de las secuencias de nucleótidos del segmento variable de la CSP

Del total de las muestras procesadas por PCR-RFLP se seleccionó una sub muestra de cada foco de transmisión que incluyera genotipos distintos de PCR-RFLP y de distintos años de la obtención de la muestra. El ADN se amplificó nuevamente por PCR con los oligonucleótidos indicados anteriormente. Los productos de PCR se purificaron con el kit comercial QIAquick PCR Purification (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN purificado se cuantificó en el equipo NanoDrop ND2000 (Thermo Scientific, USA) y las muestras en las que se logró obtener una concentración mínima de ADN de 100 ng, se enviaron a secuenciar por el método de Sanger a la Unidad High Throughput Genomics, Department of Genome Sciences, Universidad de Washington, Seattle, USA (<http://www.htseq.org>).

Análisis de los resultados

Primero, la determinación del genotipo de PCR-CSP se realizó tomando de referencia el estudio previo realizado en el Sur de Chiapas (González-Cerón, et al., 2013); se comparó el tamaño molecular del fragmento amplificado por PCR anidado y el patrón de restricción

generado por las enzimas de restricción *Alu I* y *Bst OI*. Los genotipos de la CSP identificados fueron ordenados; primero de acuerdo al tipo de repetido (vk210 o vk247), luego por el tamaño del producto amplificado y el RFLP. Se asignaron números romanos para las variante vk247 y letras minúsculas para las variantes vk210.

Se comparó la resolución del PCR-RFLP con las secuencias de nucleótidos obtenidas. De los ADN enviados a secuenciar, se revisó la calidad los cromatogramas de forma manual y las secuencias de nucleótidos se alinearon mediante el algoritmo ClustalW Multiple Alignment en el programa BioEdit 7.1.9 (Thompson, 2004). Para identificar la homología de la región carboxilo, se alinearon las secuencias con otras ya reportadas en el GenBank de distintos sitios geográficos, Centro de Nacional de información Biotecnológica (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed).

Secuencias vk210; Sur de México vk210a (JQ511280.1, JQ511263.1), vk210b (JQ511268.1), vk210d (KF437876.1); El Salvador (XM_001613018.1); Honduras (DQ156131.1); Colombia (GU339072.1, GU339085.1); Brasil (M11926.1, DQ156132.1, DQ978648.1, DQ978651.1, DQ978656.1-DQ978658.1, DQ978675.1, EU401924.1, FJ845386.1, FJ845388.1, FJ845389.1, FJ845390.1); Irán (AY367278.1, AY367286.1, AY443706.1, AY443720.1, AY632256.1, AY632287.1, AY632320.1, AY632325.1); India (EU401926.1, FJ491100.1, FJ491117.1, FJ491119.1, FJ491128.1, DQ156140.1); Tailandia (M28746.1); Corea del Sur (DQ859754.1, DQ859760.1, DQ859768.1); Corea del norte (M20670.1, AF316580.1, AF316581.1); Corea (DQ156137.1); Indonesia (DQ156135.1, EU401927.1); Filipinas (U08980.1); Islas Salomón (U08982.1); Nueva Guinea (EU401925); Gabón (U09737); Vietnam (EU401929) y Mauritania (AY674050.1).

Secuencias vk247; Sur de México (vk247-I; JQ511281.1); Tailandia (M28745.1), Brasil (M69062.1); Corea del norte (EU401928.1); Colombia (GU339063.1- GU339065.1, GU339067.1- GU339071.1, GU339075.1, GU339076.1, GU339078.1, GU339079.1, GU339082.1, GU339084.1, JN689932.1, JN689933.1); Irán (AY632316.1, AY632330.1, AY632294.1, AY632298.2, AY632299.2, AY443710.2, AY632330.1); Bangladesh (AY843440.1); Vietnam (DQ156141.1; EU401930.1) y *P. simium* (L05069.1)

Análisis de la distribución mismatch.

Para determinar las relaciones genealógicas de la región central repetida (RCR) de la CSP de los genotipos nuevos encontrados con los ya reportados, se calcularon los parámetros de la distribución mismatch (González-Cerón et al., 2013; Hughes et al., 2004).

De cada secuencia se identificó el codón de inicio y el final de la RCR, así como de cada unidad repetida. (1) Se anotó el número de unidades repetidas (UR) de cada RCR; se calculó (2) el promedio de la variación nucleotídica entre las UR (promedio p) de las comparaciones por pares entre todas las unidades repetidas (las diferencias entre cada comparación); (3) la proporción de las comparaciones pares donde p es igual a cero ($prop. = 0$), acumula las comparaciones pares donde las UR son idénticas; la proporción de todas las comparaciones donde p es mayor de 0.25 ($prop. \geq 0.25$); comparaciones pares con variación igual o mayor del 25% de las bases. El valor de asimetría (coeficiente de Pearson), mide el grado de desplazamiento de la distribución normal, si se desplaza hacia el origen de la gráfica entonces las UR del fragmento repetido se han expandido recientemente (valor positivo) comparado con el desplazamiento alejado del origen entonces la expansión de la RCR se sugiere más ancestral (valor negativo).

RESULTADOS

Amplificación del gen *csp*.

De un total de 335 muestras procesadas, 183 (55%) se amplificaron y se obtuvo el patrón PCR-RFLP. El anexo I muestra la tabla con la distribución de las muestras que amplificaron por sitio geográfico y por año. De todos los focos de transmisión y de todos los años se lograron amplificar el gen de la CSP de un grupo de muestras, aunque el mayor porcentaje de muestras que amplificaron de todos los focos fue del 2012.

Genotipos y variantes por PCR-RFLP

Del total de muestras analizadas, al 82.5% (n=151) se les asignó el genotipo vk247. Por variaciones en el tamaño del producto de PCR amplificado y el patrón de restricción se identificaron tres variantes (I, II, III). El 78.6% de las muestras fueron vk247-I (n = 144), con tamaño molecular ≈ 700 pb y como resultado de la digestión *Bst* OI se observó una banda de ≈ 225 pb (Figura 2). Mientras, en la variante vk247-II el tamaño molecular amplificado fue de ≈ 650 pb y después de la digestión se observó una banda de ≈ 150 pb (Figura 2). El vk247-III mostró un tamaño molecular similar a vk247-II pero una banda de ≈ 200 pb como resultado de la restricción (Figura 2).

El 16.9 % (n = 30) de las muestras tenían el genotipo vk210 y se identificaron cinco variantes (*a*, *b*, *d*, *g* y *h*). El vk210*a* se encontró en el 70% (21/30) de las muestras, con un fragmento amplificado de ≈ 700 pb y como resultado de la digestión con la enzima *Alu* I mostro un patrón RFLP con bandas 135, 130y 100 pb (Figura 2). El vk210*b* tuvo un fragmento amplificado similar a vk210*a* pero un RFLP con bandas de 190 pb y 130 pb (Figura. 2). La variante vk210*d* también fue de ≈ 700 pb con un patrón RFLP de 170 pb y 130 pb (Figura 2), vk210*g* fue una variante nueva con un fragmento amplificando de ≈ 600 pb y un patrón de restricción de 130 y 135pb (Figura 2), vk210*h* también fue una variante nueva con un fragmento amplificado de ≈ 700 pb con un patrón RFLP de 200 y 100 pb. Por otro lado, se encontraron dos infecciones mixtas una con los genotipos vk247-I/vk210*a* y la otra con las variantes vk210*a*/vk210*b*.

Distribución geográfica de los genotipos de la CSP de *P. vivax*

La figura 3 muestra la distribución geográfica de los genotipos por foco de transmisión en el periodo 2010-2012. El cuadro 2 muestra los resultados de las frecuencias de los genotipos encontrados por foco de transmisión desglosado por año de la toma de muestra.

En el foco de transmisión que componen los estados de Chihuahua-Sinaloa, 26 de 28 *P. vivax* fueron genotipo vk247-I. También se encontró una muestra tomada en el año 2010 que correspondió al subtipovk210*h* y otra muestra del año 2012 se identificó como la variante vk210*a*.

De forma similar, en el foco que componen las fronteras de los estados Nayarit-Jalisco- Durango, 62 de 64 muestras correspondieron a infecciones con el genotipo vk247-I, y en una muestra del 2011 se encontró la variante vk247-III, en una muestra del año 2012 se detectó una infección mixta con los genotipos vk247-I/vk210a.

En el foco de Pochutla, Oaxaca, el 100 % (n = 28) de las muestras analizadas en el periodo 2010-2012 resultaron ser variante vk247-I.

En la región de Ocosingo y Palenque, Chiapas, se encontró mayor diversidad en el gen de la CSP. De un total de 63 muestras, 28 fueron vk247-I, seis muestras del año 2012 correspondieron al subtipo vk247-II, diferente al encontrado en el foco de Nayarit-Jalisco-Durango. Veintiún muestras fueron del subtipo vk210a, cuatro muestras fueron vk210b, dos muestras pertenecieron al subtipo vk210d, en una muestra del 2012 se detectó la variante vk210g y otra muestra tenía los genotipos (vk210a/vk210b).

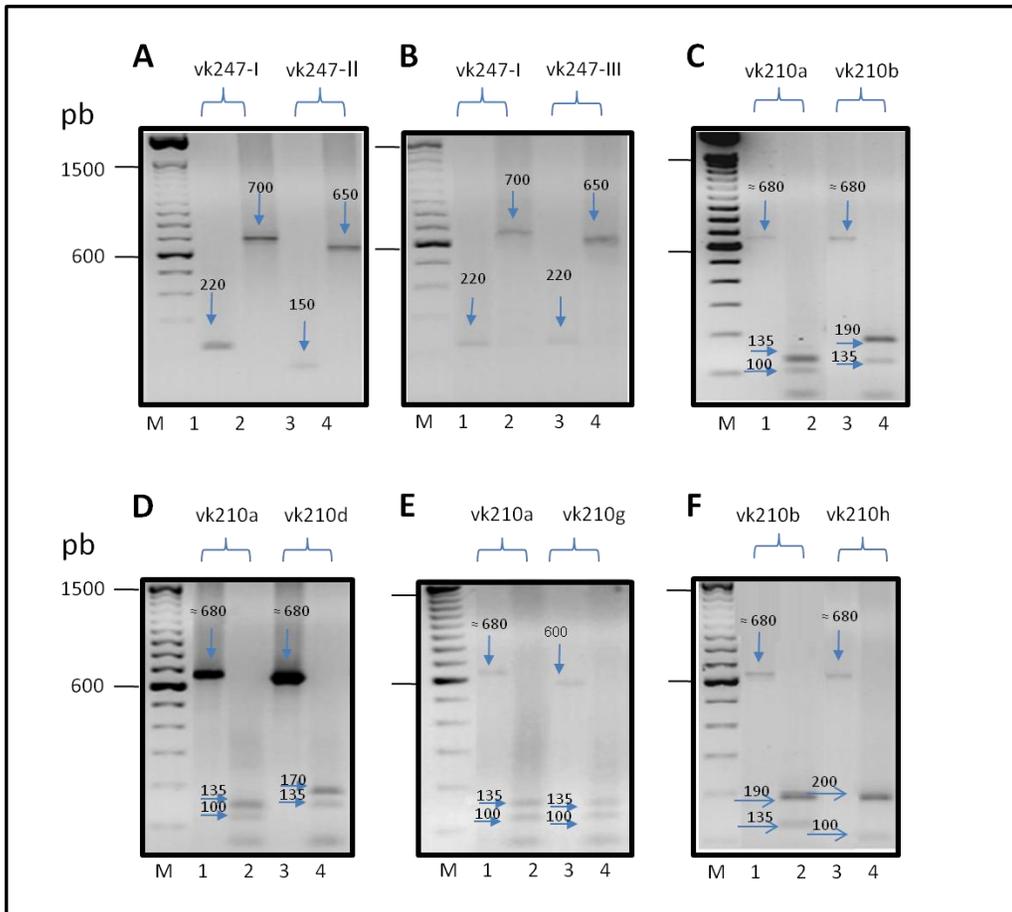


Figura 2. PCR-RFLP del gen de la proteína circunesporozoítica de *P. vivax*. Los números impares indican digestión con *Bst* OI y los números pares digestión con *Alu* I: **A)** vk247-I (carriles 1 y 2) y vk247 II (carriles 3 y 4); **B)** vk247-I (carriles 1 y 2) y vk247 III (carriles 3 y 4); **C)** vk210a (carriles 1 y 2) y vk210b (carriles 3 y 4); **D)** vk210a (carriles 1 y 2) y vk210d (carriles 3 y 4); **E)** vk210a (carriles 1 y 2) y vk210g (carriles 3 y 4); **F)** vk210b (carriles 1 y 2); vk210h (carriles 3 y 4).

Cuadro 2.- Frecuencia de los genotipos y subtipos de la CSP de *P. vivax* por PCR-RFLP en los distintos focos de transmisión en México del periodo 2010-2012.

Focos de transmisión	Año	Genotipos y variantes								Infección Mixta	Total (n)
		vk247				vk210					
		I	II	III	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>d</i>	<i>g</i>	<i>h</i>		
Chihuahua-Sinaloa	2010	6	-	-	-	.	-	-	1	-	7
	2011	7	-	-	-	-	-	-	-	-	7
	2012	13	-	-	1	-	-	-	-	-	14
	Subtotal	26	-	-	1	-	-	-	-	-	28
Nayarit-Jalisco-Durango	2010	10	-	-	-	-	-	-	-	-	10
	2011	7	-	1	-	-	-	-	-	-	8
	2012	45	-	-	-	-	-	-	-	vk210a/ vk247-I	45
	Subtotal	62	-	1	-	-	-	-	-	1	64
Pochutla, Oaxaca	2010	19	-	-	-	-	-	-	-	-	19
	2011	8	-	-	-	-	-	-	-	-	8
	2012	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	Subtotal	28	-	-	-	-	-	-	-	-	28
Palenque y Ocosingo, Chiapas	2010	6	-	-	10	-	2	-	-	-	18
	2011	6	-	-	2	3	-	-	-	-	12
	2012	16	6	-	8	2	-	1	-	vk210 (a+b)	33
	Subtotal	28	6	-	21	5	2	1	-	1	63
Total		144	6	1	21	5	2	1	1	2	183
		78.6%	3.2%	0.5%	11.5%	2.7%	1%	0.5%	0.5%	1%	

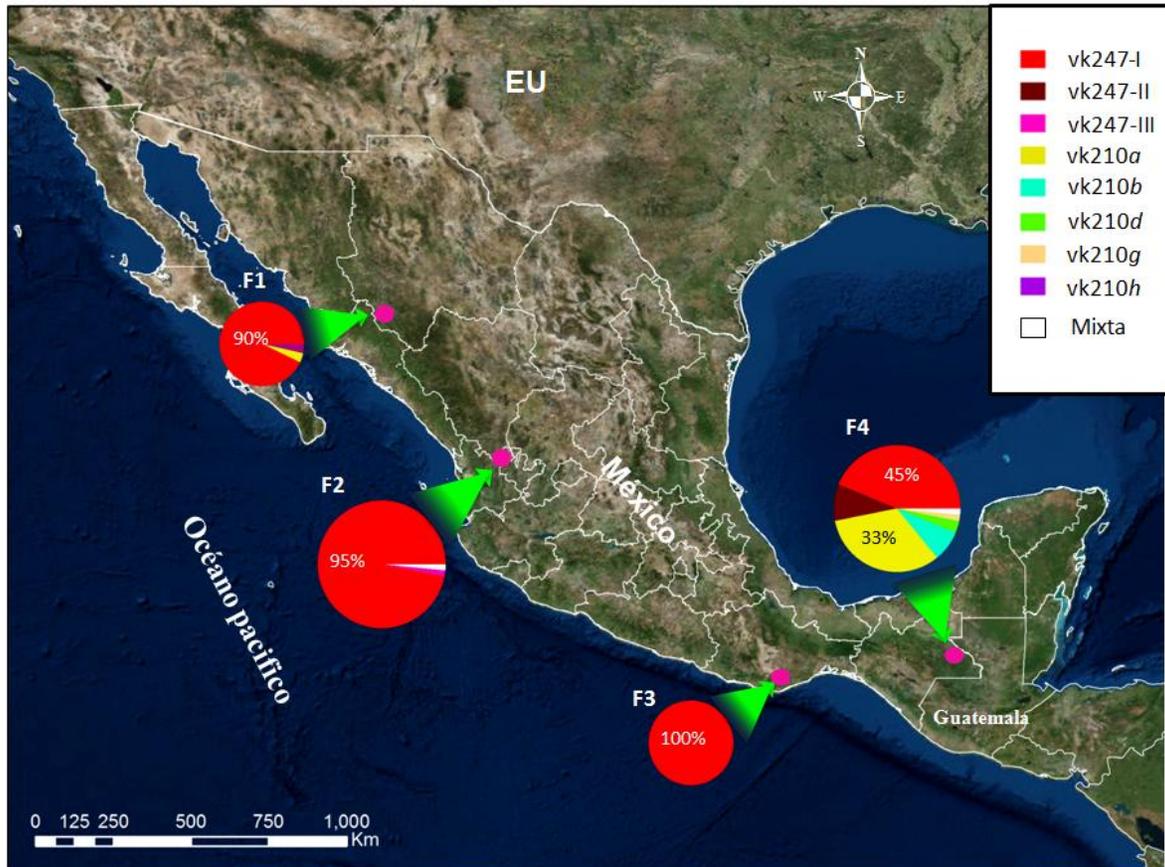


Figura 3. Distribución geográfica de los genotipos PCR-RFLP de la CSP de *P. vivax* en los distintos focos de transmisión de paludismo de México, del periodo 2010-2012. Cada círculo está en proporción de tamaño correspondiente al número de muestras analizadas. F1) Chihuahua – Sinaloa; F2) Nayarit -Jalisco – Durango; F3) Pochutla, Oaxaca; F4) Palenque y Ocosingo, Chiapas. n, número de muestras

Polimorfismos de la secuencia nucleotídica

Se obtuvieron un total de 61 secuencias de nucleótidos que comprenden desde la región I en el extremo amino hasta dominio conservado GQGQ en la región carboxilo terminal (573-639 pb). En la mayoría de los casos, en la secuencia de nucleótidos no se encontró mayor resolución que la observada por PCR-RFLP, excepto en el genotipo *vk210a* se identificaron dos variantes en la secuencia de nucleótidos. Las 43 secuencias de parásitos con secuencia *vk247-I* fueron idénticas entre ellas y a la reportada previamente en el Sur de México (JQ511281; González-Cerón et al., 2013); 10 correspondieron al foco Chihuahua-Sinaloa, 20 al foco de Nayarit-Jalisco- Durango, ocho del foco Pochutla, Oaxaca y cinco al foco Palenque y Ocosingo (para mayor detalles sobre cuantas fueron de cada año y foco de transmisión, ver anexo II).

De las dos variantes nuevas identificadas por PCR-RFLP (*vk247-II* y *-III*), la única variante *vk247-III* fue detectada en Nayarit en el año 2011, la región carboxilo variable fue similar a *vk247-I*, pero difiere en el número de UR (18 UR) (Figura 4). Las cuatro secuencias PCR-RFLP/*vk247-II* del foco Palenque y Ocosingo fueron idénticas entre ellas y con respecto a *vk247-I*; tiene la RCR idéntica y difiere en la región carboxilo, tiene una copia del dominio ANKKAGDA, similar a parásitos de Brasil (M069062) y Tailandia (M28745) (Figura 5).

Por otro lado, se secuenciaron 12 muestras del genotipo PCR-RFLP *vk210*; cinco *vk210a*, otras cinco *vk210b*, dos *vk210d*, todas del foco de Palenque y Ocosingo. En las secuencias de nucleótidos sólo se observó mayor resolución para las *vk210a*; tres *vk210a^I* y dos *vk210a^{II}*. La secuencia la variante *vk210h* detectado en Chihuahua en el 2010, fue similar la variante *vk210b*, excepto por tres polimorfismos, en la RCR tiene 17 UR (la *vk210b* tiene 18UR), un cambio de nucleótido no sinónimo en el cuarto codón de la unidad repetida # 15 (C→G) (# 16 para *vk210b*). Mientras en la región carboxilo, mostró dos copias del dominio GGNAANKKAEDA (ggaggaaacgcagcaacaagaaggcagaagacgca) (Figura 5).

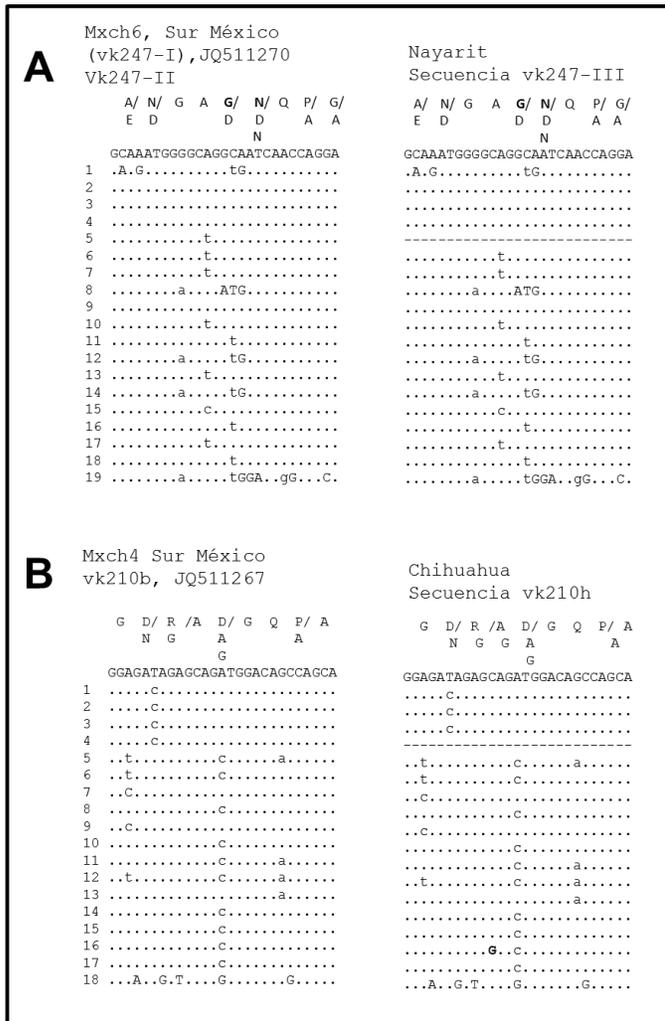


Figura 4. **A)** Comparación de la secuencia nucleótidos de la región central repetida (RCR) de la CSP de *P. vivax*. Los vk247-I (previamente reportado en el Sur de México) y el vk247-III. **B)** Comparación de la secuencia de nucleótidos de la RCR del vk210b (JQ511267) con la vk210h del estado de Chihuahua; se observan dos polimorfismos, diferencia en un repetido menos en el extremo 5' y la presencia de un cambio no-sinónimo en el repetido15 (#16 para la vk210b).

Distribución mismatch de la RCR

Para determinar las relaciones genealógicas de la RCR del gen de la CSP, se calcularon los parámetros de distribución mismatch de la secuencias novedosas vk247-III de Nayarit y de la secuencia del subtipo vk210*h* de Chihuahua (Cuadro 3). Los valores del promedio de p y la varianza se indicaron en la gráfica antes descrita (anexo III), el vk217-II se agrupó con los vk247, mientras que el vk210*h* se ubicó más cerca de los genotipos vk210*b*, *c*, *d* y de otras regiones del mundo que con los grupos de parásitos de América.

Cuadro 3. Parámetros de la distribución mistmach de la RCR del gen *csp* de *P. vivax*

Lugar de Origen	Genotipo	#UR	Promedio(P)	$Prop=0$	$P=\geq 0.25$	Coficiente de asimetría	Varianza
Chihuahua	vk210 <i>h</i>	17	0.086	0.107	0.022	1.054	0.003
Nayarit	vk247III	18	0.094	0.114	0.091	1.29	0.007

Los parámetros para vk210aI, vk210aII, vk210b, vk210d y vk247-I/II fueron previamente reportados para parásitos del Sur de México (anexo III). RCR, región central repetida; UR= unidades repetidas.

Figura 5. Comparación de las secuencias de nucleótidos de la región carboxilo terminal de CSP de *P. vivax* de los genotipos vk210 y vk247. Se indican las secuencias de las variantes vk210*a*, *b*, *d*, *h* y de los vk247-I, -II y vk247-III.

Amino acid:	G G N A	A N K K A E/G D A	G G N A	A N K K A E D A	G G N A	G G/A
Nucleotide:	ggaggaaacgca	gcaaacacaagaaggcagaagacgca	ggaggaaacgca	gcaaacacaagaaggcagaagacgca	ggaggaaacgca	ggagga
Mx vk210a (Sali, <i>P. simium</i>)	*****	*****	*****	*****
Mx vk210b,ct..g	*****	*****3x
Mx vk210dt..g	*****	*****
Mx vk210ht..gt..g
vk247:	last repeat (G G Q A A) ggtggacaggcagca			G A (G G Q A A G G N A A N K K A G D A) ggagcaggtggacaggcagcaggaggaatgctgcaaacacaaaaggcaggagacgca		
I,III* (F1-4) SMx /Perú (Irán)t..ta.....G.....	*****C..
II* (F4), Thailand, Brazil, <i>P. Simium</i>t..ta.....G.....	*****	*****C..

(.) Indica homología; (*) indica ausencia del nucleótido; la secuencia terminal 3' hasta justo antes del dominio QGQG. vk210*h* fue novedosa y detectada en el estado de Chihuahua. Figura modificada de González-Cerón et al., 2013 (la vk210*c* fue reportada para el Sur de México)

DISCUSION

La historia del paludismo en México; los cambios en la intensidad de transmisión, la extensión del territorio afectado, la distribución de vectores, los programas de control han contribuido a moldear las poblaciones de *P. vivax* de la actualidad. En México, se ha sugerido que el paludismo fue detectado desde el siglo XV y que además en la Nueva España, los españoles, otros europeos y africanos llegaban infectados. Es posible que únicamente los genotipos del parásito que fueron infectivos a los anofelinos autóctonos se dispersaran rápidamente en el país y en la región. Pero, el conocimiento de la enfermedad y la transmisión fueron determinantes para el desarrollo de las medidas de control en la detección y tratamiento de casos y el control del vector. Entre 1950 y 1960, se registró una importante reducción del número de casos. Después de este periodo y por distintas razones se reportaron fluctuaciones en la intensidad de transmisión y número de casos (Betanzos, 2011). El ascenso más dramático fue en los 80's, se reportaron más de 100,000 casos anuales por varios años. Más recientemente la reducción significativa de casos ha conducido a que México se identifique como uno de los países en fase de pre-eliminación (WHO, 2012). La identificación de los genotipos circulantes en los actuales focos persistentes de paludismo en México es relevante para la vigilancia epidemiológica molecular.

Aunque se detectaron tres variantes del genotipo vk247 en los focos de transmisión del Pacífico, la variante vk247-I fue la más frecuente en las muestras del 2010-2012, está distribuida a lo largo del pacífico desde Chihuahua hasta Oaxaca, lo que coincide con la amplia distribución del vector *Anopheles pseudopunctipennis* (Fernández-Salas et al., 1994; Sinka et al., 2012). Los estudios de infectividad reportados en el Sur de México sugieren que éste es un excelente vector del genotipo *P. vivax* vk247-I (González-Cerón et al., 1999, 2010; Rodríguez et al., 2000). Pero no hay evidencia que su amplia dispersión corresponda a que es más permisible que las otras dos nuevas variantes encontradas con el genotipo vk247. Adicionalmente, el vk247-I parece ser la única variante el causante del brote en Nayarit en el 2012.

En la zona Ocosingo-Palenque se encontró con mayor diversidad y en frecuencias similares de ambos genotipos vk247 (I y II) y vk210 (*a, b, d, g*). Cuatro de los seis genotipos (vk247-I y vk210*a, b, d*) fueron reportados también en el Soconusco, Chiapas (González-Cerón et al., 2013). En estas regiones se han reportado la presencia de varias especies de *Anopheles* (Sinka et al., 2012) por ejemplo *Anopheles albimanus*, *Anopheles pseudopunctipennis* y *Anopheles vestitipennis* (Casas-Martínez et al., 2006) y *Anopheles darlingi* (C. Villarreal, comunicación personal) que pudieran mantener la transmisión de estos genotipos. Esta zona históricamente ha presentado mayor intensidad de transmisión, con riesgo permanente de brotes asociados a casos recurrentes, a la migración internacional y al movimiento continuo entre las comunidades fronteriza, por el intercambio comercial y laboral (Betanzos-Reyes, 2011; 2012).

Las regiones afectadas de Chiapas comparten condiciones ecológicas e historia de transmisión del paludismo con países de América Central (AC), donde la mayor transmisión de *P. vivax* se le atribuye a *An. albimanus* (Warren et al., 1980; López et al., 2012). Esto es consistente con los estudios de laboratorio con colonias de mosquitos que mostraron que los parásitos vk210 de la costa del Soconusco, México fueron infectivos a *An. albimanus* (González-Cerón et al., 2013). Los reportes actuales sugieren la baja frecuencia o ausencia del genotipo vk247 en Guatemala (Mendizabal y Padilla, 2003), Honduras (Lopez et al., 2012) y Nicaragua (González-Cerón et al., 2013). La mayor diversidad en la frontera Sur de México y las diferencias en los genotipos que prevalecen en el Norte de México versus AC sugieren la presencia de una barrera ecológica, pero los *An. pseudopunctipennis* están presentes en AC (Sinka et al., 2012) la dispersión del genotipo vk247 podría ser factible; se ha sugerido que el vk247-I migro al Sur de México (Joy et al., 2008; González-Cerón et al., 2013), éste se detectó primero a principios de los 90's (Kain et al., 1992) y después de algunos eventos climáticos, por ejemplo después del huracán Paulina en 1998, se dispersó y se favoreció su transmisión en el Sur de Chiapas, detectado en mayor frecuencia a partir de 1997 (González-Cerón et al., 1999; Rodríguez et al., 2000). Si este es un evento reciente, es posible que otros eventos climatológicos también puedan favorecer su dispersión en regiones de AC.

La diversidad encontrada en el gen de la CSP se debe principalmente a la variación en el número de repetidos de la RCR y a la contracción o expansión de la región carboxilo, que son probablemente producidas por el desplazamiento de la polimerasa (termino en inglés; replication slippage) durante la replicación de ADN del parásito en la mitosis (Hughes et al., 2004; Dias et al., 2013). Las similitudes de las secuencias encontradas en la RCR dada por la distribución mismatch y en la región carboxilo agrupan a los variantes de la *csp* encontradas en este estudio y en el Sur de México (González-Cerón et al., 2013), en los vk247 (I, II, III); el grupo vk210*b, c, d, h* por la presencia del dominio ANKKAEDA y similitud en la RCR; distinto del grupo vk210*a* (Americano). Si estos corresponden a un pool génico más diverso y con variantes exclusivas de la región requiere ser investigado; las secuencias vk210*b, c, d, h* mostraron alta similitud en la RCR pero ninguna fue idéntica a las reportadas para parásitos de otros sitios geográficos y la variante vk210*h* con dos copias del dominio GGNAANKKAEDA es la primera vez que se reporta en el mundo. Muchas de las variantes fueron probablemente eliminadas por las intensas medidas de control; al disminuir la extensión del territorio afectado y la intensidad de la transmisión en el Pacífico y en el Sur de Chiapas. A diferencia de la alta diversidad de los vk210 y vk247 reportado en Irán (Zakeri et al., 2006) y de los vk247 en Colombia (Hernández- Martínez., 2011).

Es importante mencionar que la única forma de conocer y caracterizar los parásitos de *P. vivax* en los focos de transmisión con situación de conflicto social y de difícil acceso con comunidades afectadas dispersas, fue mediante la obtención de la muestra de las laminillas que concentra el programa de control de paludismo en México. Además, el muestreo de al menos 3 años permitió evidenciar algunos genotipos poco frecuentes o raros en los sitios de estudio, por ejemplo: en Sinaloa, el vk210*a* en el año 2012 y en Chihuahua, el vk210*h* en el año 2010. En Nayarit se encontró el vk247-III en una muestra del 2011, mientras el vk247II se detectó en seis muestras de Ocosingo-Palenque del año 2012. Lo que sugiere que un estudio más extenso pudiera descubrir genotipos adicionales a los encontrados.

La disminución o pérdida de diversidad parasitaria podría ser un indicador del éxito de los programas de control y pre-eliminación (Arnott et al., 2012). En los focos del Pacífico, la reducción en el número de casos ha sido sostenida, sobre todo en el foco de Pochutla, Oaxaca, aquí sólo se detectó la variante vk247-I, misma que se había detectado en el 2006 (González-Cerón et al., 2013). Este sitio ha sido implementado varias medidas de control basadas en la participación de las comunidades y que eventualmente están conduciendo a la casi eliminación del parásito en la región. En los años 2010, 2011 y 2012 se reportaron 161, 28 y 8 casos, respectivamente. Mientras en el 2013 sólo se reportó un caso (DGE, 2014). En el foco del Noroeste, a pesar de la poca diversidad encontrada, la persistencia de la transmisión puede estar acompañada de la limitada participación del programa de control del paludismo, debido a la intensa actividad delictiva de narcotráfico y de cultivo de estupefacientes y en el foco de Nayarit por los movimientos de la población entre comunidades dispersas y de difícil acceso (Betanzos-Reyes, 2011).

Esta información contribuye a comprender la epidemiología molecular, dinámica de la transmisión y dispersión de los genotipos de *P. vivax* en el país, también esta información es de utilidad en la vigilancia parasitaria, para identificar parásitos causantes de brotes, persistentes, re-emergentes o introducidos. Los resultados de este trabajo contribuyen a construir un banco de genotipos circulantes en México, pero será necesario contar con mayor información sobre las características biológicas de los genotipos y variantes detectadas, su relación con los casos asintomáticos, frecuencia y temporalidad de casos por recaídas, transmisibilidad, factores que contribuyen a la persistencia de la transmisión.

BIBLIOGRAFIA

Arnott A, Barry A, and Reeder J: **Understanding the population genetics of *Plasmodium vivax* is essential for malaria control and elimination.** *Malar J* 2012, **11**: 14.

Arnot DE, Barnwell JW, Tam JP, Nussenzweig V, Nussenzweig RS, Enea V: **Circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax*: gene cloning and characterization of the immunodominant epitope.** *Science* 1985, **230**:815–818.

Betanzos Reyes AF: **La malaria en México. Progresos y desafíos hacia su eliminación.** *Bol Med Hosp Infant Mex* 2011,**68**:159-168.

Betanzos- Reyes AF, González- Cerón L, Rodríguez MH, Torres Monzon JA: **Seroepidemiología del paludismo en un grupo de migrantes en tránsito (Chiapas, 2008).** *Salud Publica Mex* 2012, **54**:523-529.

Casas-Martínez M, Orozco Bonilla A: **Diversidad y distribución geográfica de *Anopheles* en el Sur de México.** *CONABIO, biodiversidad* 2006, **67**: 12-15.

Chenet M, Tapia L, Escalante A, Durand S, Lucas C, Bacon D: **Genetic diversity and population structure of genes encoding vaccine candidate antigens of *Plasmodium vivax*.** *Malar J* 2012, **11**:68.

Choi YK, Choi KM, Park MH, Lee EG, Kim YJ, Lee BC, Cho SH, Rhie HG, Lee HS, Yu JR, Lee JS, Kim TS, Kim JY: **Rapid dissemination of newly introduced *Plasmodium vivax* genotypes in South Korea.** *Am J Trop Med Hyg* 2010, **82**:426-32.

Coppi A, Natarajan R, Pradel G, Bennett BL, James ER, Roggero MA, Corradin G, Persson C, Tewari R, Sinnis P: **The malaria circumsporozoite protein has two functional domains, each with distinct roles as sporozoites journey from mosquito to mammalian host.** *J Exp Med* 2011, **208**:341-356.

Dias S, Wickramarachchi T, Sahabandu I, Escalante A a, Udagama P V: **Population genetic structure of the *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein (Pvcsp) in Sri Lanka.** *Gene Elsevier B.V* 2013, **518**:381–7.

Dirección general de epidemiología de México: **Anuarios de morbilidad: información epidemiológica 1984-2012.** Consultado 08 de julio de 2014. Disponible en: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/boletin/intd_historicos.html

Fernandez Salas I, Rodriguez MH, Roberts DR, Rodriguez MC, Wirtz RA: **Bionomics of adult *Anopheles pseudopunctipennis* (Diptera: Culicidae) in Tapachula area of Southern México.** *J Med Entomol* 1994; **31**:663-670.

González-Cerón L, Alvarado Delgado-A, Martínez-Barnetche J, Rodríguez MH, Ovillamunoz M, Pérez F, Hernández-Avila JE: **Sequence variation of ookinete surface proteins Pvs25 and Pvs28 of *Plasmodium vivax* isolates from Southern Mexico and their association to local anophelines infectivity.** *Infect Genet Evol* 2010 ; **10**:645-54.

González-Cerón L, Martínez-Barnetche J, Montero-Solís C, Santillán F, Soto AM, Rodríguez MH, Espinosa B, Chavez O: **Molecular epidemiology of *Plasmodium vivax* in Latin America: polymorphism and evolutionary relationships of the circumsporozoite gene.** *Malaria journal* 2013, **12**:243.

Gonzalez-Ceron L, Rodriguez MH, Nettel JC, Villarreal C, Kain KC, Hernandez JE: **Differential susceptibilities of *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis* to infections with coindigenous *Plasmodium vivax* variants VK210 and VK247 in southern Mexico.** *Infection and immunity*. 1999, **67**:410–412.

González- Cerón L, Santillan F, Nettel-Cruz JA, Palomeque-Culebro OL, Sandoval M: **Comparación de las susceptibilidades de *Anopheles pseudopunctipennis* de distintas regiones geográficas de México a cepas de *Plasmodium vivax* del Soconusco, Chiapas.** *Entomología medica* 2004: 773-777.

Guerra CA, Tatem AJ, Noor AM, Snow RW: **The global distribution and population at risk of malaria: past, present and future.** *Lancet Infect Dis* 2004, **4**:327-36.

Hernández - Martínez MA, Escalante AA, Arévalo-Herrera M, Herrera S. **Antigenic diversity of the *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein in parasite isolates of Western Colombia.** *Am J Trop Med Hyg* 2011,**84**:51-7.

Hughes AL: **The Evolution of Amino Acid Repeat Arrays in *Plasmodium* and Other Organisms.** *J mol evol*, 2004, **59**:528–35.

Kain KC, Brown E, Webster HK, Wirtz R, Keystone JS, Rodriguez MH: **Circumsporozoite genotyping of global isolates of *Plasmodium vivax* from dried blood specimens.** *Journal of clinical microbiology* 1992, **30**:1863–6.

Lopez AC, Ortiz A, Coello J, Sosa-Ochoa W, Torres RE, Banegas EI, Jovel I, Fontecha GA: **Genetic diversity of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* in Honduras.** *Malar J* 2012,11:391.

Mendizabal R, Padilla N: **Diversidad genética de *Plasmodium vivax* en regiones de alto riesgo de malaria en Guatemala.** *Rev Univ Valle de Guatemala* 2003;**15**: 62-79.

Organización Mundial de la Salud (OMS): **Paludismo, nota descriptiva No. 94**. Marzo de 2013. Consultado 13 de abril de 2013. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/es/>

Organización Panamericana de la Salud (PAHO): **Malaria in the Region of the Americas. Report 2011-regional-SP-1**.

Warren M, Mason J, Hobbs J: **Natural infections of *Anopheles albimanus* with *Plasmodium* in a small malaria focus**. *Am J Trop Med Hyg* 1980; 503-6.

World Health Organization (WHO): **Defeating malaria in Asia, the Pacific, Americas, Middle East and Europe Progress & impact**. series, n. 9, Noviembre de 2012; Disponible en: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241504430>

Rodriguez MH, Gonzalez- Ceron L, Hernández JE, Nettel JA, Villareal C, Kain K , Wirtz R: **Different prevalences of *plasmodium vivax* phenotypes vk210 and vk247 associated with the distribution of *anopheles albimanus* and *anopheles pseudopunctipennis* in Mexico**. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 2000; **62**: 122-127.

Rosenberg R, Wirtz RA, Lanar DE, Sattabongkot J, Hall T, Waters AP, Prasittisuk C: **Circumsporozoite protein heterogeneity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax***. *Science* 1989, **245**:973–976.

Sinka ME1, Bangs MJ, Manguin S, Rubio-Palis Y, Chareonviriyaphap T, Coetzee M, Mbogo CM, Hemingway J, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, Kabaria CW, Burkot TR, Harbach RE, Hay SI: **A global map of dominant malaria vectors**. *Parasit Vectors* 2012 ,5:69.

Souza-Neiras W C, Moreno Storti ML, Machado Dantas L: **The genetic diversity of *Plasmodium vivax*: a review.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2007, **102**: 245-254.

Taylor JE, Pacheco MA, Bacon DJ, Beg MA, Dantas Machado RL, Fairhurst RM, Herrera S, Kim JY, Menard D, Povoas MM, Villegas L, Mulyanto, Snounou G, Cui L, Zeyrek FY, Escalante AA: **The evolutionary history of *Plasmodium vivax* as inferred from mitochondrial genomes: parasite genetic diversity in the Americas.** *Mol Biol Evol* 2013, **13**:2050–2064.

Zakeri S, Abouie Mehrizi A, Djadid ND, Snounou G: **Circumsporozoite protein gene diversity among temperate and tropical *Plasmodium vivax* isolates from Iran.** *Tropical medicine & international health* 2006, **11**:729–737.

Anexo I. Número de muestras que amplificaron para el gen de la proteína circunsporozoítica de *Plasmodium vivax* de distintos focos de transmisión de México en el periodo 2010-2012.

Origen de las muestras*	Año	n, muestras procesadas	n, muestras amplificadas para el gen <i>csp</i>
Chihuahua-Sinaloa	2010	30	7 (25%)
	2011	20	7(25%)
	2012	25	14(50%)
	Sub total	75	28 (37%)
Nayarit-Jalisco-Durango	2010	29	10(34%)
	2011	20	8(40%)
	2012	65	46(70%)
	Sub total	114	64 (56%)
Pochutla, Oaxaca	2010	32	19 (59%)
	2011	12	8(66%)
	2012	2	1(50%)
	Sub total	46	28 (60%)
Palenque y Ocosingo, Chiapas.	2010	32	18(56%)
	2011	20	12(60%)
	2012	48	33(68%)
	Sub total	100	63 (64%)
Total		335	183 (55%)

n, número de muestras; *focos de transmisión

Anexo II.- Total de la muestras de *P. vivax* que se obtuvo la secuencia de ADN (s) del gen *csp* en el periodo 2010-2012.

Foco de transmisión	Año	VK247I		Vk247II		VK247III		VK210a		VK210b		VK210d		Vk210h		TOTAL8	
		N	%S	n	%S	n	%S	n	%S	n	%S	N	%S	n	%S	n	%S
Chihuahua-Sinaloa	2010	6	2 (33)	-	-	-	-	-	-	1(100)	-	-	-	1	-	7	3(42)
	2011	7	2 (33)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	2(28)
	2012	13		-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	14	7(50)
	Subtotal	26		-	-	-	-	1	1	1(100)	-	-	-	1	-	28	12(42)
			10(38)														
Nayarit-Jalisco-Durango	2010	10	8(80)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	8(80)
	2011	7	1(14)	-	-	1	1(100)	-	-	-	-	-	-	-	-	8	8(25)
	2012	45	11(24)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	46	11(23)
	Subtotal	62	20(33)	-	-	1	1(100)	-	-	-	-	-	-	-	-	64	21(32)
Pochutla, Oaxaca	2010	19	3(15)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19	3(15)
	2011	8	4(50)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	3(37)
	2012	1	1(100)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1(100)
	Subtotal	28	8(28)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	28	8(28)
Palenque y Ocosingo, Chiapas	2010	6		-	-	-	-	1	2(20)	-	-	2	2(100)	-	-	18	4(22)
	2011	6	3(50)	-	-	-	-	3	1 (33)	3	3(100)	-	-	-	-	12	7(58)
	2012	16	2(12)	6	4(66)	-	-	8	2(25)	2	2(100)	-	-	-	-	33	10(30)
	Subtotal	28	5(17)	6	4(66)	-	-	2	5(23)	5	5(100)	2	2(100)	-	-	63	21(33)
							1										
Total		14	43(30)	6	4(66)	1	1(100)	2	6(28)	6	6(100)	2	2(100)	1	1(100)	183	61(33)
		4						1									

n= número de muestras %S= Porcentaje de muestras secuenciadas. De 183 se obtuvo la secuencia de 61 aislados de *P. viva*

Anexo III.- Tabla de parámetros de distribución mismatch de la RCR-*cspvk247* de *P. vivax* en Latinoamérica y otras regiones del mundo (Tomada de González-Cerón et al., 2013). En negritas se señalan los resultados de los parámetros de muestras con RCR variantes (*vk247-III* y *vk210h*).

País de Origen	Strain/isolate	#RU	Average p	$Prop=0$	$prop > 0.25$	Skewness	GenBank TM
Thailand	PFAC1RPTA	20	0.078	0.175	0.095	2.234	M28745.1
Colombia	Pt03	18	0.088	0.137	0.092	1.44	GU339084.1
Colombia	Vc05	18	0.089	0.131	0.092	1.41	GU339079.1
Colombia	Ch03	20	0.091	0.163	0.084	1.224	GU339067.1
Bangladesh	Bangladesh	26	0.092	0.185	0.065	1.157	AY843440.1
Brazil	B7-4	20	0.092	0.153	0.068	1.117	M69062.1
Colombia	Ch04	18	0.092	0.157	0.092	1.168	GU339068.1
Vietnam	VietnamVI	21	0.093	0.138	0.081	1.396	DQ156141.1
Colombia	Ch01	18	0.093	0.137	0.092	1.221	GU339065.1
<u>Nayarit México*</u>	<u>vk247-III</u>	<u>18</u>	<u>0.094</u>	<u>0.114</u>	<u>0.091</u>	<u>1.29</u>	
Colombia	Vc01	20	0.094	0.153	0.084	1.163	GU339075.1
Iran	CHPVCS11	20	0.095	0.147	0.079	1.329	AY443710.2
Brazil	<i>P. simium</i> II	21	0.095	0.157	0.071	1.118	L05069.1
Colombia	Ca05	20	0.095	0.132	0.084	1.186	GU339064.1
Iran	CHPVCS33	20	0.096	0.116	0.079	1.251	AY632294.2
Colombia	Pt02.1	18	0.096	0.131	0.092	1.291	GU339082.1
Iran	CHPVCS37	20	0.097	0.158	0.079	1.089	AY632298.2
Iran	CHPVCS55	19	0.098	0.158	0.082	1.11	AY632316.1
<u>Mexico/Peru</u>	<u>Mxch6/PeruI</u>	<u>19</u>	<u>0.098</u>	<u>0.146</u>	<u>0.088</u>	<u>1.105</u>	<u>JQ511270.1/ JQ511286.1</u>
Colombia	Vc02	20	0.099	0.132	0.074	1.041	GU339076.1
Colombia	Ca04	20	0.1	0.132	0.074	1.042	GU339063.1
Vietnam	Palo alto c2	20	0.1	0.09	0.08	1.38	EU401930.1
Colombia	Nr02	20	0.101	0.105	0.074	1.083	GU339071.1
Colombia	Vc04	18	0.101	0.092	0.085	1.155	GU339078.1
Colombia	Nr01	20	0.104	0.132	0.068	0.821	GU339070.1
North Korea	North Korea	19	0.104	0.117	0.105	1.22	^a EU401928.1
Iran	CHPVCS38	20	0.106	0.095	0.079	1.096	AY632299.2
Colombia	Ch05	20	0.106	0.111	0.079	1.291	GU339069.1

* Muestra de Nayarit vk247 III no reportada anteriormente para México.

Pais de Origen	Strain/isolate	#RU	Average ρ	Prop= 0	Prop > 0.25	Skewness	GenBank TM
Brazil	O13B-2	18	0.054	0.203	0	0.276	DQ978675.1
Colombia	Nr03	20	0.058	0.307	0	1.462	GU339072.1
<u>Mexico</u>	<u>Mxch3-vk210a^I</u>	<u>20</u>	<u>0.068</u>	<u>0.17</u>	<u>0</u>	<u>-0.207</u>	<u>JQ511265.1</u>
Honduras	Honduras III	20	0.068	0.17	0	-0.207	DQ156131.1
Colombia	Pt04.1	20	0.069	0.144	0	-0.202	GU339085.1
Gabon	G24	19	0.069	0.129	0	0.087	^a U09737.1
Brazil	Brazil IV	18	0.069	0.19	0.026	1.384	FJ845386.1
<u>Nicaragua</u>	<u>Nir1-vk210a^{III}</u>	<u>22</u>	<u>0.07</u>	<u>0.209</u>	<u>0</u>	<u>0.016</u>	<u>JQ511282.1</u>
El Salvador	Sal I	20	0.071	0.15	0	-0.256	XM_001613018
Brazil	O10	19	0.072	0.205	0.018	1.099	DQ978656.1
Brazil	O4	18	0.073	0.163	0.033	1.292	DQ978651.1
<u>Nicaragua</u>	<u>Nichg-vk210f</u>	<u>18</u>	<u>0.074</u>	<u>0.17</u>	<u>0.013</u>	<u>1.107</u>	<u>JQ511284.1</u>
<u>Nicaragua</u>	<u>Nichn-vk210e</u>	<u>19</u>	<u>0.075</u>	<u>0.111</u>	<u>0</u>	<u>-0.312</u>	<u>JQ511285.1</u>
Brazil	Brazil (VII)	19	0.075	0.193	0.018	1.001	FJ845389.1
Brazil	Brazil I clone I	21	0.077	0.173	0	-0.474	DQ156132.1
Brazil	Brazil (VIII)	21	0.077	0.129	0	-0.467	FJ845391 .1
Brazil	Brazil I	19	0.077	0.105	0	-0.41	^b EU401924.1
Brazil	Belem	20	0.077	0.17	0	1.082	M11926.1
Brazil	I7	19	0.077	0.15	0	1.091	DQ978657.1
Brazil	I3	19	0.077	0.123	0.012	1.35	DQ978658.1
Brazil	<i>P. simium</i> I	21	0.078	0.119	0.014	1.104	L05068.1
<u>Mexico</u>	<u>Mxch13-vk210a^{II}</u>	<u>20</u>	<u>0.079</u>	<u>0.17</u>	<u>0</u>	<u>1.05</u>	<u>JQ511280.1</u>
Brazil	Brazil (VII)	20	0.079	0.137	0.011	1.05	FJ845390.1
<u>Mexico</u>	<u>Mxch14-vk210d</u>	<u>18</u>	<u>0.079</u>	<u>0.143</u>	<u>0.013</u>	<u>1.03</u>	<u>US</u>
Iran	P28	18	0.08	0.131	0.013	1.13	AY632256.1
India	India (03-1)	18	0.08	0.131	0.013	1.13	DQ156140.1
India	NE12	19	0.081	0.118	0	1.591	FJ491119.1
Philippines	PH-46	18	0.081	0.124	0.033	1.281	U08980.1
Vietnam	Palo alto c1 (Vietnam IV)	16	0.081	0.103	0.066	1.493	^{c, d} EU401929.1
<u>Mexico</u>	<u>Mxch4-VK210b</u>	<u>18</u>	<u>0.082</u>	<u>0.15</u>	<u>0.013</u>	<u>0.966</u>	<u>JQ511267.1</u>
Iran	P59	18	0.082	0.144	0.013	1.041	AY632287.1
Solomon	SOL-83	18	0.082	0.118	0.013	1.13	^e U08982.1
Iran	CHPVCS7	18	0.082	0.098	0.013	1.152	AY443706.1
Indonesia	Indonesia XIX	16	0.082	0.117	0.017	1.16	^d EU401927.1
Iran	CHPVCS21	18	0.084	0.111	0.013	1.097	AY443720.1
Mauritania	Mauritania	18	0.084	0.111	0.013	1.097	AY674050.1
Iran	P9	18	0.084	0.105	0.013	1.112	AY367286.1

North Korea	KNIH	18	0.084	0.111	0.02	0.937	AF316581.1
South Korea	KPVCSP01-22	18	0.084	0.111	0.02	0.937	DQ859754.1
India	NE10	18	0.084	0.118	0.039	1.195	FJ491117.1
Thailand	PFAC1RPTB	18	0.084	0.137	0.085	1.641	M28746.1
India	India VII	16	0.086	0.117	0.025	1.084	^d EU401926.1
Iran	KPVCS6	17	0.087	0.096	0.015	1.084	AY632325.1
Vk210h*	Chihuahua	17	0.086	0.107	0.022	1.054	-
Iran	P1	16	0.088	0.092	0.017	1.033	AY367278.1
Korea	Korea (02-9)	18	0.088	0.085	0.02	0.89	DQ156137.1
Indonesia	Indonesia VII	18	0.088	0.111	0.02	0.991	DQ156135.1
<u>Mexico</u>	<u>Mxch3-vK210c</u>	<u>12</u>	<u>0.092</u>	<u>0.152</u>	<u>0.015</u>	<u>0.755</u>	<u>JQ511266.1</u>
Iran	KPVCS1	17	0.092	0.074	0.015	1.027	AY632320.1
New Guinea	Chesson I	16	0.094	0.183	0.017	0.398	^d EU401925.1
India	ND3	13	0.094	0.192	0.038	0.564	FJ491100.1
North Korea	KNIH	12	0.102	0.061	0.03	0.717	AF316580.1
India	NEO10	10	0.102	0.044	0.089	0.935	FJ491128.1
South Korea	KPVCSP02-20	20	0.105	0.092	0	0.478	DQ859760.1
North Korea	PFACSCA	20	0.111	0.137	0	0.194	M20670.1
South Korea	KPVCSP02-39	20	0.135	0.098	0	-0.273	DQ859768.1

Anexo IV. Gráfica del promedio (p) y la varianza de la distribución mistmach de la RCR de *P. vivax* vk247 y vk210 de Latinoamérica y otras regiones del mundo (tomada de González-Cerón et al., 2013). Se anexan los datos de las muestras con genotipo vk247-III y vk210h que se agrupa con los vk210b y d del Soconusco (indicados con las flechas).

