

Diversidad genética de *Plasmodium vivax* en regiones de alto riesgo de malaria en Guatemala

Lic. Renata Mendizábal Cabrera

Dra. Norma Padilla

Resumen

A pesar que los parásitos de *Plasmodium vivax* son responsables de más del 96% de los casos de malaria en Guatemala y Centroamérica, se han realizado pocos estudios acerca de la diversidad genética de esta especie en la región. En este estudio se analizaron muestras de ADN obtenidas a partir de láminas de gota gruesa de pacientes con infecciones positivas por *P. vivax*, procedentes de áreas endémicas del norte, sur y sur-este de Guatemala. Cada muestra fue analizada para el gen de la proteína del circumsporozoito (CSP) y para dos regiones variables del gen de la proteína 1 de superficie del merozoito (MSP1), la primera localizada entre los bloques conservados (ICB por sus siglas en inglés - Interspecies Conserved Block-) ICB2-ICB3, y la segunda entre los bloques ICB5-ICB6. Los resultados mostraron que para el gen CSP, todos los aislados de las tres regiones estudiadas pertenecen al tipo VK210, dentro del cual se encontraron siete variantes genéticas. En cuanto al gen MSP1 ICB2-ICB3, se identificaron cinco subtipos diferentes, mientras que para el gen MSP1 ICB5-ICB6, se encontraron nueve subtipos.

Introducción

En Guatemala se reportan alrededor de 57,000 casos de malaria anualmente, que corresponden a una tasa de incidencia del 9.07 por mil habitantes. Aproximadamente, el 98% de las infecciones son debidas a *Plasmodium vivax*, mientras que el restante 2% a *Plasmodium falciparum*. La región norte del país aporta más del 65% de los casos de malaria debido, en parte, a la constante colonización de grandes áreas de territorio y al difícil acceso de la población al diagnóstico y tratamiento de la enfermedad. De acuerdo a datos del índice parasitario anual (IPA) del año 2001, la mayor incidencia de malaria se reportó en los departamentos de El Quiché, en específico el municipio de Ixcán (66.71); en el departamento de El Petén (65.37); y en el de Alta Verapaz (46.30) (Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social -MSPAS-, datos no publicados).

En varias regiones del mundo se ha determinado que los parásitos responsables de la malaria presentan una diversidad genética significativa, la cual se ha descrito en términos

morfológicos, bioquímicos, clínicos y moleculares. Dentro de los estudios moleculares, se han realizado diversos trabajos sobre estructura poblacional en *Plasmodium falciparum* y en menor escala en *Plasmodium vivax*. En Guatemala no se han realizado estudios específicos acerca de la estructura poblacional de *P. vivax*, a pesar que entre el 96 a 98% de la infecciones de malaria son ocasionadas por esta especie. Sin embargo, ya se han realizado estudios preliminares acerca de la epidemiología molecular de esta especie utilizando como marcador la proteína 1 de superficie del merozoito (MSP1) ICB5-6 en poblaciones del sur del país (Tiquisate, Escuintla). Estos estudios fueron realizados mediante el uso de las técnicas de PCR y SSCP (De Urioste, datos no publicados) y se identificó la presencia de cinco diferentes genotipos de *P. vivax* en muestras de pacientes para el día cero (previo al tratamiento) y días de recurrencia. En la mayoría de los casos, los genotipos identificados en los días de recurrencia correspondieron a los genotipos identificados en el día 0 y no se encontró ninguna asociación significativa entre el genotipo responsable de la infección y la presencia de recurrencias. Tampoco se encontró asociación estadísticamente significativa entre los genotipos identificados y el género o edad del paciente, así como tampoco entre el total de formas sexuales y asexuadas en gota gruesa. Sin embargo, si se observó asociación entre la temperatura corporal y las infecciones causadas por diferentes alelos del parásito, lo cual sugiere que el genotipo del parásito si influye en las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

En relación con este estudio, un análisis preliminar del gen para la MSP1 ICB5-6

en muestras provenientes del norte del país (Ixacán, El Quiché) mostró la presencia de alelos diferentes para este gen, los cuales forman un grupo genéticamente distinto al grupo de alelos encontrados en el área sur (datos no publicados). Esto sugiere la presencia de diferentes genotipos de *P. vivax* en distintas áreas del país, lo cual cobra mayor importancia por el hecho que estas localidades (norte y sur) presentan características epidemiológicas distintas en cuanto a tasas de incidencia, niveles de transmisión, inmunidad de la población y niveles de exposición a medicamentos. Todo esto hace necesaria una evaluación geográficamente más amplia de la estructura poblacional de *P. vivax*.

El método tradicional de diagnóstico de la malaria a través del examen microscópico proporciona muy poca información adicional acerca de las variaciones entre parásitos de la misma especie. Por esto y por la creciente necesidad de obtener datos epidemiológicos de la enfermedad, se recurrió al desarrollo de otras técnicas que iniciaron con el análisis de isoenzimas y el uso de anticuerpos monoclonales orientados a antígenos de superficie del parásito. Los resultados de estas investigaciones probaron que muchas de las infecciones de malaria son causadas por parásitos pertenecientes a más de un tipo genético. Sin embargo, la dificultad de cultivar y mantener en cultivo los parásitos de *Plasmodium vivax* fueron un obstáculo para el desarrollo de estas técnicas. Con los adelantos de la biología molecular y, en particular, de la técnica de PCR, se permitió que el estudio de estas variantes genéticas fuera posible a mayor escala y con menor inversión de tiempo (1). Los métodos más comúnmente utilizados para estos estudios moleculares incluyen el diseño

de iniciadores específicos a determinados alelos, los cuales pueden ser luego identificados por polimorfismos de tamaño de los productos de PCR, polimorfismo de tamaño de regiones repetitivas, PCR y polimorfismo de tamaño de fragmentos de restricción y, en menor escala, hibridación de productos de PCR con sondas específicas a determinados alelos (12).

Los estudios moleculares que se han realizado en relación a la genética de los parásitos de la malaria se han enfocado en dos aspectos principales: la estructura de la genética de poblaciones de los parásitos y su dinámica dentro del hospedero; y la diversidad de genes específicos que codifican para proteínas inmunogénicas (antígenos para vacunas) y genes que codifican para proteínas asociadas con resistencia a medicamentos antimaláricos (2, 3). Estos estudios permiten conocer los genotipos presentes en una región determinada, lo cual es relevante ya que determina características importantes de los parásitos como su origen, antigenicidad, respuesta a medicamentos, surgimiento de cepas resistentes a una o varias drogas, respuesta a posibles vacunas y el impacto de medidas de control como los mosquiteros impregnados (2). Conocer la estructura poblacional de una especie en particular, permite también explicar la posible tasa de dispersión de nuevos genotipos y la forma como estos evolucionan y se ven afectados por la selección (3).

La diversidad genética de *P. vivax* ha sido descrita a través del análisis de varios genes, en particular los que codifican para antígenos que están bajo selección por presión causada por el sistema inmune del hospedero, como los genes

que codifican para las proteínas de superficie del merozoito (MSP), en particular para la MSP1 y MSP3 α , antígenos de la membrana apical (AMA1), proteína del circumsporozoito (CSP), proteínas "Duffy binding", genes que codifican para la sub-unidad 18S del ARN ribosomal y DHFR (dihidrofolato reductasa) (2).

El gen que codifica para la proteína del circumsporozoito (CSP) de *P. vivax* ha sido estudiado ampliamente; es un gen de una sola copia que posee un dominio central de secuencias repetidas en serie, rodeado por secuencias conservadas, no repetitivas. Entre las diferentes especies de *Plasmodium*, las secuencias repetitivas de la región central son variables en tamaño y en naturaleza de la secuencia. Se han identificado dos variantes la VK247 y VK210 (4, 5). Estas variantes se han detectado en varios países de América como infecciones ocasionadas por una sola variante o como infecciones mixtas. Se ha sugerido que la presencia de infecciones mixtas depende del grado de prevalencia de malaria en la región, siendo menor en regiones de baja prevalencia. También se ha encontrado asociación entre la variante del parásito responsable de la infección, el ecosistema y la especie del vector encontrado en esa región determinada (6).

También se han realizado estudios sobre la diversidad genética de *P. vivax* a través de los genes que codifican para las proteínas de superficie del merozoito (MSP), de las cuales ya se han clonado siete genes. Entre estos ya ha sido descrito el gen para la MSP1 el cual comparte muchas similitudes con los genes que codifican para esta proteína en parásitos de especies como *P.*

falciparum y *P. yoelli*. El gen para la MSP1 consta de diez bloques de secuencias conservadas en relación con otras especies, las cuales están alternadas por regiones variables (7). Estas regiones variables han sido el objetivo de las investigaciones sobre diversidad genética, ya que el gen completo es demasiado largo para su estudio. El bloque variable entre las regiones ICB5 e ICB6 ha sido de mucha utilidad en estudios de polimorfismo ya que posee repeticiones de CAA/CAG de longitud variable, lo que permite distinguir fácilmente entre genotipos (8). También se han observado diferentes grados de polimorfismo entre otras regiones (9, 10).

Materiales y Métodos

- **Recolección de Muestras:**

Con la colaboración del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, se recolectaron muestras de gota gruesa de pacientes febriles con diagnóstico microscópico positivo para *P. vivax*, en las Áreas de Salud de El Petén Sur-occidental, Izabal, Ixcán y Escuintla, durante los meses de agosto de 2004 a mayo de 2005.

- **Selección de las Muestras:**

De las muestras obtenidas, se escogieron para su análisis únicamente las muestras que cumplieron con los criterios de selección: boleta completa de datos generales; diagnóstico microscópico positivo para malaria por *Plasmodium vivax*; cantidad adecuada de muestra (1,000 o más leucocitos por gota gruesa); tinción adecuada de la gota gruesa y

parasitemia mayor a 25 formas asexuadas por cada 1,000 leucocitos.

- **Identificación de genotipos para los genes CSP; MSP1 ICB2-3 y MSP1 ICB5-6.**

Extracción de ADN

Se extrajo el ADN del parásito de las láminas de gota gruesa, siguiendo el protocolo descrito por Etoh y colaboradores (11) con algunas modificaciones. Brevemente, se lavaron tres veces las láminas de gota gruesa con metanol absoluto y se dejaron secar toda la noche. Se lavaron nuevamente con solución de Na₂HPO₄ 100 mM y se raspó el extendido, el cual se colocó en un tubo estéril. Se agregaron 200 uL de Na₂HPO₄ 5 mM, se agitó y se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se repitió el lavado. El sedimento resultante se resuspendió en 30 uL de agua destilada-desionizada y se hirvió en baño de agua por 10 min., agitando después de los primeros 5 min. Se centrifugó nuevamente a 12,000 rpm durante 3 min. y el sobrenadante se tomó directamente para el PCR.

Confirmación molecular de la especie de parásito

Se amplificó el gen que codifica para la región 18S del ARN ribosomal de *Plasmodium*, utilizando un PCR anidado. En el primer PCR se amplificó una región género específica, para lo cual se prepararon 20 uL de reacción (para muestras y controles), conteniendo una concentración final de 2.5 mM de cloruro de magnesio, 2.5 ng/uL de cada uno de los iniciadores rPLU5¹ y rPLU6¹ (CDC,

¹ Snounou y colaboradores (12)

Atlanta), 0.2 mM dNTP's, 0.4 U de polimerasa "hot-start" TAP (CLP, EEUU), buffer de la polimerasa en concentración 1X y 2 uL de ADN. Se amplificaron las muestras utilizando un termociclador iCycler (Bio-Rad, EEUU), con el programa siguiente: un ciclo de 95°C por 15 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 2 min y 72°C por 2 min. Finalmente, un ciclo de extensión a 72°C por 10 min. En el segundo PCR se amplificó una región especie-específica para *P. vivax* y *P. falciparum*, para lo cual se prepararon también 20 uL de reacción conteniendo las mismas concentraciones de reactivos, pero con los iniciadores (CDC, Atlanta) rVIV1¹ y rVIV2¹ para *P. vivax* y rFAL1¹ y rFAL2¹ para *P. falciparum*, y 3 uL de productos del primer PCR. Se amplificaron las muestras utilizando un termociclador iCycler (Bio-Rad, EEUU), con el programa siguiente: un ciclo de 95°C por 15 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 2 min y 72°C por 2 min. Finalmente, un ciclo de extensión a 72°C por 10 min. A continuación se tomaron 5 uL de productos del segundo PCR, se mezclaron con 1 uL de colorante (Sigma PCR Marker, EEUU) y se separaron en un gel de agarosa al 1.5% en buffer de Tris-Boratos-EDTA (TBE) 1X, conteniendo bromuro de etidio (1:32000). Se cargaron en el gel 4 uL de marcador de masa molecular (Sigma PCR Marker, EEUU) y se separaron por electroforesis durante 30 min. a 80 volts. Luego se expuso el gel a luz UV y se capturó la imagen con un sistema de documentación digital. Para el resto del análisis, únicamente se tomaron en cuenta las muestras positivas para *P. vivax* y negativas para *P. falciparum*.

Amplificación

Se amplificaron los genes CSP; MSP1 ICB2-ICB3 y MSP1 ICB5-ICB6 a través de dos PCR anidados, utilizando iniciadores de secuencias diseñadas por el Dr. John Barnwell del Centro para Control y Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (CDC, Atlanta). Para el primer PCR se prepararon 20 uL de reacción, para las muestras y controles, conteniendo una concentración final de 2.5 mM de cloruro de magnesio, 0.26 uM de cada uno de los iniciadores (gen CSP: PVCSPF1 y PVCSPR1; gen MSP1 ICB2-3: PVMS1D2/3F1 y PVMS1D2/3R1; gen MSP1 ICB5-6: PVMS1D5F1 y PVMS1D5R1), 0.2 mM dNTP's, 0.4 U de polimerasa "hot-start" TAP (CLP, EEUU), buffer de la polimerasa en concentración 1X y 1 uL de ADN. Se amplificaron las muestras utilizando un termociclador iCycler (Bio-Rad, EEUU), con el programa siguiente: un ciclo de 95°C por 15 min, seguido de 30 ciclos de 95°C por 30 s, 57°C (para el gen CSP) ó 50°C (para el gen MSP1) por 30s y 72°C por 3 min. Finalmente, un ciclo de extensión a 72°C por 10 min. Para el segundo PCR se prepararon también 20 uL de reacción conteniendo los mismos reactivos a las mismas concentraciones, pero utilizando los iniciadores siguientes: gen CSP: PVCSPF2 y PVCSPR2; gen MSP1 ICB2-3: PVMS1D2/3F2 y PVMS1D2/3R2; gen MSP1 ICB5-6: PVMS1D5F2 y PVMS1D5R2. Se amplificaron las muestras utilizando un termociclador iCycler (Bio-Rad, EEUU), con el programa siguiente: un ciclo de 95°C por 15 min, seguido de 30 ciclos de 95°C por 30 s, 46°C (para el gen CSP) ó 50°C (para el gen MSP1) por 30s y 72°C por 3 min. Finalmente, un ciclo de extensión a 72°C por 10 min. Se tomaron 5 uL de

productos del segundo PCR se mezclaron con 1 uL de colorante (Sigma PCR Marker, EEUU) y se separaron en un gel de agarosa al 1.5% en buffer de Tris-Boratos-EDTA (TBE) 1X, conteniendo bromuro de etidio (1:32000). Se cargaron en el gel 4 uL de marcador de masa molecular (Sigma PCR Marker, EEUU) y la electroforesis se realizó durante 30 min. a 80 volts. Luego se expuso el gel a luz UV y se capturó la imagen con un sistema de documentación digital.

Secuenciación

Se purificaron los productos de PCR utilizando filtros Montage PCR (Millipore EW-29951-20, EEUU), según el protocolo sugerido por el fabricante. La secuenciación automática de los productos con amplificación positiva para los genes analizados se realizó tanto en la hebra sentido ("forward"), como en la hebra contra-sentido ("reverse"), obteniéndose dos secuencias por cada producto de PCR.

Análisis de secuencias

- *Obtención de secuencias consenso.* Las secuencias obtenidas fueron analizadas a través de los programas SeqMan II y EditSeq, versión 5.3 (DNASTAR, EEUU), con los cual se editaron y asignaron las bases ambiguas o faltantes, se alinearon las hebras sentido y contrasentido de cada producto de PCR, para obtener la secuencia consenso entre ambas, e identificar el marco de lectura correcto.
- *Alineación de secuencias.* Las secuencias consenso de las muestras que amplificaron para cada gen analizado fueron alineadas utilizando el programa MEGA, versión 3.0 (Kumar, Tamura, Nei 2004).

- *Traducción de la secuencia de nucleótidos a proteínas.* Se tradujo las secuencias de nucleótidos a secuencia de aminoácidos, utilizando el programa MEGA, versión 3.0.

- *Identificación de variantes y clasificación de muestras.* Se analizaron las secuencias de aminoácidos generadas y se clasificaron las variantes identificadas en subtipos. Las muestras amplificadas para cada gen fueron asignadas a cada uno de los subtipos identificados.

- *Determinación de similitudes con tipos reportados en bases de datos internacionales.* La secuencia nucleotídica y aminoácida de cada uno de los subtipos identificados se comparó contra bases de datos internacionales (MEGABLAST, National Center for Biotechnology Information) para determinar su similitud contra secuencias ya reportadas a nivel mundial.

Elaboración de árboles filogenéticos

Utilizando los subtipos identificados, se calculó un árbol filogenético para cada uno de los genes estudiados, utilizando el método de inferencia de *Neighbor-Joining*, con el modelo de sustitución nucleotídica de Tamura-Nei y una evaluación por *bootstrap* de 5,000 réplicas, utilizando el programa MEGA, versión 3.0.

Resultados

• **Recolección y Selección de Muestras**

Las muestras recolectadas que cumplieron con los criterios de selección, fueron 123, de las cuales 33 corresponden a la región de El Petén Sur-occidental, 31 a Ixcán, El Quiché, 28 a Izabal y 31 a Escuintla.

• **Identificación de genotipos para los genes CSP; MSP1 ICB2-3 y MSP1 ICB5-6.**

Del total de muestras seleccionadas, se confirmaron como *P. vivax* (a través del PCR del gen para la 18S) 96 de las 123 (29 de El Petén, 19 de El Quiché, 20 de Izabal y 28 de Escuintla). En estas muestras, el porcentaje de amplificación de los genes propuestos fue entre 40-75%, a excepción de las muestras de Ixcán, para las que se obtuvo una amplificación menor al 11%, por lo que no fueron tomadas en cuenta para el análisis subsiguiente.

Las secuencias obtenidas para cada uno de los genes evaluados, se analizaron y se eliminaron las muestras para las cuales se obtuvo fragmentos incompletos de la región amplificada. En el caso del gen CSP, fueron eliminadas 25 muestras, para el gen MSP1 ICB2-3 se eliminó una muestra y para el gen MSP1 ICB5-6 se eliminaron 6 muestras. La secuencia del resto de las muestras se editó, eliminando los extremos 5' y 3' de cada una, y asignando bases ambiguas de forma manual.

Se realizó un alineamiento preliminar de todas las secuencias para cada gen,

utilizando el protocolo de Clustal (MEGA3). Se terminaron de alinear las secuencias manualmente, utilizando como referencia el extremo conservado carboxilo terminal de las moléculas. De esta forma, se clasificaron las muestras de acuerdo a su similitud, estableciéndose los subtipos para cada gen. Finalmente, la secuencia nucleotídica y aminoácida de cada uno de los subtipos identificados se comparó contra bases de datos internacionales para determinar su similitud con secuencias ya reportadas a nivel mundial, las cuales se incluyeron como referencia para la elaboración de los árboles filogenéticos.

• **Gen CSP**

Se determinó que las secuencias obtenidas de las 17 muestras obtenidas de las tres áreas geográficas analizadas (Izabal, El Petén y Escuintla) pertenecen al tipo VK210. Se identificaron 7 subtipos que muestran variaciones en cuanto al número y tipo de residuo peptídico repetitivo entre GDRAAGQPA y GDRADGQPA, los cuales se originan por la presencia de codones no sinónimos en las secuencias, los cuales dan origen a un residuo de alanina (A – GCT-) o de ácido aspártico (D – GAT-). A pesar de pertenecer al tipo VK210, los 7 subtipos identificados tienen secuencias similares a las reportadas para el gen CSP del tipo Honduras III, Salvador I, Belem, y recombinantes entre las anteriores (Figuras 1 y 2). De los 7 subtipos, únicamente uno de ellos (G) presenta una mutación no sinónima en el extremo 3', GDRAAGQAA. El sub-tipo más frecuente para el gen CSP fue el E (Tabla 2).

M28746.1 VK210	PA	GDRAAGQPA	GDRADGQPA	GDRAAGQPA	GDRADGQPA	GDRAAGQPA	GDR [77]
DQ156131.1 HondurasIIID....D....	... [77]
DQ156134.1 SalvadorID....D....	... [77]
M11926.1 BelemD....D....D....	... [77]
Sub-tipo AD....D....	... [77]
Sub-tipo BD....D....	... [77]
Sub-tipo CD....D....D....	... [77]
Sub-tipo DD....D....	... [77]
Sub-tipo ED....D....D....	... [77]
Sub-tipo FD....D....	... [77]
Sub-tipo GD....D....	... [77]
M28746.1 VK210	ADGQPA	GDRAAGQPA	GDRAAGQPA	GDRADGQPA	GDRAAGQPA	GDRADGQP	[127]
DQ156131.1 HondurasIII	.A....D....A....D....A....	[127]
DQ156134.1 SalvadorI	.A....D....A....D....A....	[127]
M11926.1 Belem	.A....D....	[127]
Sub-tipo A	.A....D....A....D....A....	[127]
Sub-tipo B	.A....D....A....D....A....	[127]
Sub-tipo C	.A....D....A....D....A....	[127]
Sub-tipo D	[127]
Sub-tipo E	.A....D....	[127]
Sub-tipo F	.A....D....	[127]
Sub-tipo G	.A....D....A....D....A....	[127]
M28746.1 VK210	A	GDRAAGQPA	GDRAAGQPA	GDRAAGQPA	GNGAGGQAA	GGNAGGNAG	GNAG [178]
DQ156131.1 HondurasIIID....DR.A..P.	.RA..QA..	... [178]
DQ156134.1 SalvadorID....DR.A..P.	.RA..QA..	... [178]
M11926.1 BelemDR.A..P.	.AG.QA..	... [178]
Sub-tipo AD....DR.A..P.	.RA..QA..	... [178]
Sub-tipo BD....DR.A..P.	.RA..QA..	... [178]
Sub-tipo CD....DR.A..P.	.RA..QA..	... [178]
Sub-tipo DD....DR.A..P.	.RA..QA..	... [178]
Sub-tipo EDR.A..P.	.AG.QA..	... [178]
Sub-tipo FDR.A..P.	.RA..QA..	... [178]
Sub-tipo GD....A..	.DR.A..P.	.RA..QA..	... [178]
M28746.1 VK210	QGQNN	EGANAPNEK	SVKEYLD	[201]			
DQ156131.1 HondurasIII	[201]			
DQ156134.1 SalvadorI	[201]			
M11926.1 Belem	[201]			
Sub-tipo A	[201]			
Sub-tipo B	[201]			
Sub-tipo C	[201]			
Sub-tipo D	[201]			
Sub-tipo E	[201]			
Sub-tipo F	[201]			
Sub-tipo G	[201]			

Figura 1: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de siete subtipos del gen para la CSP identificados a partir de 17 muestras provenientes de tres áreas endémicas para malaria en Guatemala (Izabal, El Petén y Escuintla). Los puntos indican los residuos aminoácidos iguales, en referencia a la secuencia superior (VK210). Se incluyen las secuencias reportadas para los tipos VK210, Honduras III, Salvador I y Belem (Acc. No. M28746.1, DQ156131.1, DQ156134.1 y M11926.1, respectivamente).

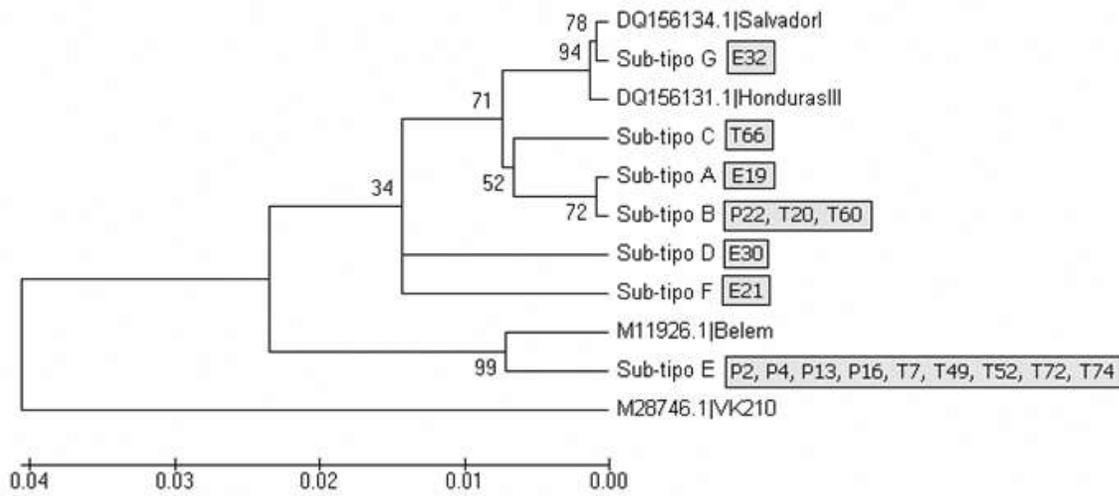


Figura 2: Árbol de distancia de los subtipos identificados para el gen CSP, a partir de secuencias de 603 nucleótidos. Se incluyen como referencia las secuencias reportadas para los tipos VK210, Honduras III, Salvador I y Belem (Acc. No. M28746.1, DQ156131.1, DQ156134.1 y M11926.1, respectivamente). Las muestras pertenecientes a cada sub-tipo se muestran en gris y los códigos corresponden a P=Petén, T=Escuintla y E=Izabal. Método de inferencia del árbol: *Neighbor-Joining*; modelo de sustitución: nucleótida Tamura-Nei; *bootstrap* 5,000 réplicas.

• **Gen MSP1 ICB2-3**

Para las muestras amplificadas para el gen MSP1 ICB2-3 (31), se identificaron 5 subtipos correspondientes a aislados reportados previamente (Figuras 3 y 4). La mayoría de las muestras (10), identificadas como sub-tipo D, pertenecían al tipo del aislado de Brasil, BR44. Las 4 muestras del sub-tipo C pertenecen al tipo del aislado Belem. Los restantes subtipos parecen ser producto de la recombinación entre aislados; el sub-tipo A producto de la recombinación entre los aislados TC103

y TG46, aunque presenta mutaciones no sinónimas que dan origen a un cambio en la secuencia de cuatro aminoácidos en el extremo 3' de la región amplificada. Estas mutaciones no se observaron en ninguno de los otros subtipos identificados. El sub-tipo B se cree que es producto de la recombinación entre los tipos TG46 y Belem, mientras que el sub-tipo E entre los aislados BP30 y TC103. El sub-tipo más frecuente para el gen MSP1 ICB2-3 fue el sub-tipo D (Tabla 2).

AF435603.1 TC103	ITKNKKTIDN	INKLISTEND	KRNGQYTDMI	NGNGTQADGT	QGTGGSSETT	[50]
Sub-tipo A	[50]
AF435611.1 TG46D..A	..G.....	[50]
Sub-tipo BE..SD..A	..G.....	[50]
AF435594.1 BelemE..SD..A	..G..S.NTT	..T.A.NNAA	..S..NT..G	[50]
Sub-tipo CE..SD..A	..G..S.NTT	..T.A.NNAA	..S..NT..G	[50]
AF435631.1 BR44E..SD..A	..GS.S.NTT	..T.A.NNAA	..S..NT..G	[50]
Sub-tipo DE..SD..A	..GS.S.NTT	..T.A.NNAA	..S..NT..G	[50]
AF435625.1 BP30D..KK	..SD..TE.HK	..G....ST	..S...A.T..H	..T.A....S	[50]
Sub-tipo ED..KK	..SD..TE.HK	..G....ST	..S...A.T..H	..T.A....S	[50]
AF435603.1 TC103	QNSGSSGTGL	TRSGSSDSGS	SGTGSTGNIS	HSAAPAASSP	TDENYTNKKA	[100]
Sub-tipo A	[100]
AF435611.1 TG46--	---	QP.....	[100]
Sub-tipo B--	---	QP.....	[100]
AF435594.1 Belem	TR.S-----	---A..NTL	G.D.T.VVGT	S.P....P.S	.N.D.DE..K	[100]
Sub-tipo C	TR.S-----	---A..NTL	G.D.T.VVGT	S.P....P.S	.N.D.DE..K	[100]
AF435631.1 BR44	TQ.S-----	---A..NTL	G.A.T.VVGT	S.P....P.S	.NA..EA..I	[100]
Sub-tipo D	TQ.S-----	---A..NTL	G.A.T.VVGT	S.P....P.S	.NA..EA..I	[100]
AF435625.1 BP30	SG.SV.SVS-	---...N...R	S.Q.R.D.RS	..TD.NA..I	[100]
Sub-tipo E	SG.SV.SVS-	---...N...R	S.Q.R.D.RS	..TD.NA..I	[100]
AF435603.1 TC103	IFQAVYNIIF	YTNQLQEAQK	LIAVLEKRVK	VLKEHKDIKV	LLEQVAKEKE	[150]
Sub-tipo ALKE.....	[150]
AF435611.1 TG46LKE.....	..E.....I.....	[150]
Sub-tipo BLKE.....	..E.....I.....	[150]
AF435594.1 Belem	.Y..M..G..	..S..E....	..E.....G..AEA..K	[150]
Sub-tipo C	.Y..M..G..	..S..E....	..E.....G..AEA..K	[150]
AF435631.1 BR44	.Y..I..G..E....	..E.....G..AEA..K	[150]
Sub-tipo D	.Y..I..G..E....	..E.....G..AEA..K	[150]
AF435625.1 BP30T..	[150]
Sub-tipo ET..	[150]
AF435603.1 TC103	KLPKDNNTTT	NLTN-VHKEA	ESKIAELEKK	IEAIKTVN		[189]
Sub-tipo A	...S.YPN..-	[189]
AF435611.1 TG46	N.....	T..A-EQ.A	Q....D....	.VD.....		[189]
Sub-tipo B	N.....	T..A-EQ.A	Q....D....	.VD.....		[189]
AF435594.1 BelemN	P..DEQQ.A	QK...D..SQ	.V.N.....		[189]
Sub-tipo CN	P..DEQQ.A	QK...D..SQ	.V.N.....		[189]
AF435631.1 BR44N	P..DEQQ.A	QK...D..SQ	.V.....		[189]
Sub-tipo DN	P..DEQQ.A	QK...D..SQ	.V.....		[189]
AF435625.1 BP30	T..A-EQ.A	Q.....		[189]
Sub-tipo E-		[189]

Figura 3: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de cinco subtipos del gen para la MSP1 ICB2-3 identificados a partir de 31 muestras provenientes de tres áreas endémicas para malaria en Guatemala (Izabal, El Petén y Escuintla). Los puntos indican los residuos aminoácidos iguales, en referencia a la secuencia superior (TC103). Se incluyen las secuencias reportadas para los aislados TC103, TG46, Belen, BR44 y BP30 (Acc. No. AF435603.1, AF435611.1, AF435594.1, AF435631.1 y AF435625.1, respectivamente).

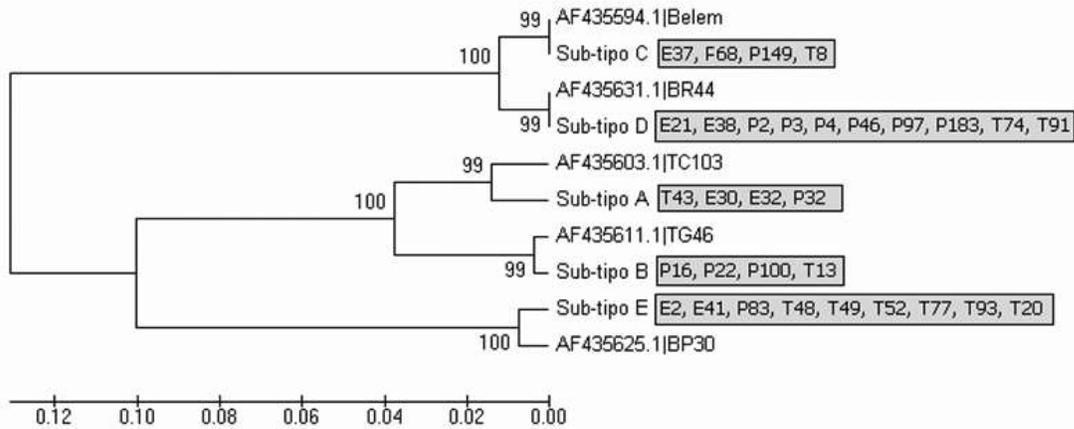


Figura 4: Árbol de distancia de los subtipos identificados para el gen MSP1D2/3, a partir de secuencias de 567 nucleótidos. Se incluyen las secuencias reportadas para los aislados TC103, TG46, Belen, BR44 y BP30 (Acc. No. AF435603.1, AF435611.1, AF435594.1, AF435631.1 y AF435625.1, respectivamente). Las muestras pertenecientes a cada sub-tipo se muestran en gris y los códigos corresponden a P=Petén, T=Escuintla y E=Izabal. Método de inferencia del árbol: *Neighbor-Joining*; modelo de sustitución: nucleótida Tamura-Nei; *bootstrap* 5,000 réplicas.

• **Gen MSP1 ICB5-6**

Se determinó que las secuencias obtenidas de las 40 muestras analizadas en las tres áreas geográficas estudiadas (Izabal, El Petén y Escuintla) pertenecen a los tipos Salvador I y Belem, con algunas variantes, producto de mutaciones no sinónimas o recombinación entre estos tipos (Figuras 5 y 6). La mayoría de las muestras (15), identificadas como sub-tipo E, pertenecen al tipo Salvador I, con tres mutaciones no sinónimas, que dan como producto aminoácidos diferentes en los residuos 53, donde la valina (V) cambia por un residuo de alanina (A), 104, donde cambia una isoleucina (I) por una treonina (T), y 48, donde cambia una prolina (P) por una glutamina (Q). También presenta una inserción que origina un residuo de Q en

la posición 47 (Figuras 7 y 8). El sub-tipo C, representado por una muestra proveniente del departamento de Escuintla, muestra una mutación no sinónima que origina un cambio en el la posición 15 donde el residuo de alanina (A) es reemplazado por uno de valina (V). Además, también presenta una inserción que origina un residuo adicional de prolina (P) en la posición 47. Esta inserción también se observa en las muestras pertenecientes al sub-tipo B (n=9). En cuanto al sub-tipo A presenta una única mutación no sinónima, en relación al tipo Salvador I, en el residuo 24, donde el residuo de serina (S) es reemplazado por uno de alanina (A).

En cuanto a las muestras del tipo Belem, la identificada como sub-tipo F,

proveniente del departamento de El Petén, presenta una eliminación del residuo 73 de glutamina. El sub-tipo G muestra una inserción de tres codones repetitivos que originan tres residuos adicionales de glutamina en las posiciones 80, 81 y 82.

El sub-tipo H (4 muestras) parece ser producto de la recombinación de los aislados Salvador I y Belem, ya que en el extremo 5' presenta una secuencia similar al tipo Salvador I, mientras que el extremo 3' y la región de poli-Q es similar al aislado Belem. Además, presenta una mutación no sinónima que origina un cambio en el

residuo aminoácido 87, donde una valina (V) cambia por una leucina (L). El mismo tipo de recombinación se observa en las muestras del tipo I (n=4), en el que además se observa una eliminación de tres codones respecto al tipo Belem, lo que ocasiona la ausencia de tres residuos de glutamina (Q) en las posiciones 77, 78 y 79. En la Tabla 1 se muestra un resumen de número de residuos repetitivos de glutamina para cada uno de los subtipos identificados. El sub-tipo más frecuente para el gen MSP1 ICB5-6 fue el sub-tipo E (Tabla 2).

Tipo o sub-tipo (n)	Número de residuos de glutamina (Q)
Belem	23
Sub-tipo F (1)	22
Sub-tipo G (3)	26
Sub-tipo H (4)	21
Sub-tipo I (4)	18

Tabla 1: Número de residuos de glutamina identificados en cada uno de los subtipos correspondientes al aislado Belem y recombinantes, para el gen MSP1 ICB5-6.

M75674.1 Salvador I	ESMIATEKNK	PTVAAADIVA	KGQSLRGASE	TGTTGNTVNA	QTAVVQ-PQH	[50]
Sub-tipo AA.....	[50]
Sub-tipo BP...	[50]
Sub-tipo CV.....P...	[50]
Sub-tipo DQQ..	[50]
Sub-tipo EQQ..	[50]
AF435594.1 BelemA. ---SAP.T	S..L...S..	-AA.EV.T..	V.SE..QQ.Q		[50]
Sub tipo FA. ---SAP.T	S..L...S..	-AA.EV.T..	V.SE..QQ.Q		[50]
Sub tipo GA. ---SAP.T	S..L...S..	-AA.EV.T..	V.SE..QQ.Q		[50]
Sub tipo HQQ.Q	[50]
Sub tipo IQQ.Q	[50]
M75674.1 Salvador I	QVNAVTVQP	GTTGHQAQGG	EAETQTNSV-	--QAAQVQOT	PAGAGGQVAS	[100]
Sub-tipo A	[100]
Sub-tipo B	[100]
Sub-tipo C	[100]
Sub-tipo D	[100]
Sub-tipo E	..A.....	[100]
AF435594.1 Belem	-----.- ----Q.Q.QQ	QQQQ.QQQQ-	--.QS..VPA	...DAQ..I.		[100]
Sub tipo F	-----.- ----Q.Q.QQ	QQ-Q.QQQQ-	--.QS..VPA	...DAQ..I.		[100]
Sub tipo G	-----.- ----Q.Q.QQ	QQQQ.QQQQQ	QQ.QS..VPA	...DAQ..I.		[100]
Sub tipo H	-----.- ----Q.Q.QQ	QQQQ.QQQQ-	----S-LVPA	...DAQ..I.		[100]
Sub tipo I	-----.- ----Q.Q.QQ	QQQQ-Q----	----S..VPA	...DAQ..I.		[100]
M75674.1 Salvador I	TQTISQAPAP	TQASPEPAPA	APPSTPAAAV	APAPTMSKLE	YLE	[143]
Sub-tipo A	[143]
Sub-tipo B	...T.....	[143]
Sub-tipo C	...T.....	[143]
Sub-tipo D	...T.....	[143]
Sub-tipo E	...T.....	[143]
AF435594.1 Belem	..PT..SA.. -GV.AT...-	----.....A	...A.....	...		[143]
Sub tipo F	..PT..SA.. -GV.AT...-	----.....A	...A.....	...		[143]
Sub tipo G	..PT..SA.. -GV.AT...-	----.....A	...A.....	...		[143]
Sub tipo H	..PT..SA.. -GV.AT...-	----.....A	...A.....	...		[143]
Sub tipo I	..PT..SA.. -GV.AT...-	----.....A	...A.....	...		[143]

Figura 5: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de 9 subtipos del gen para la MSP1 ICB5-6 identificados a partir de 40 muestras provenientes de tres áreas endémicas para malaria en Guatemala (Izabal, El Petén y Escuintla). Los puntos indican los residuos aminoácidos iguales, en referencia a la secuencia superior (Salvador I). Se incluyen las secuencias reportadas para los aislados Salvador I y Belen (Acc. No.M75674.1 y AF435594.1, respectivamente).

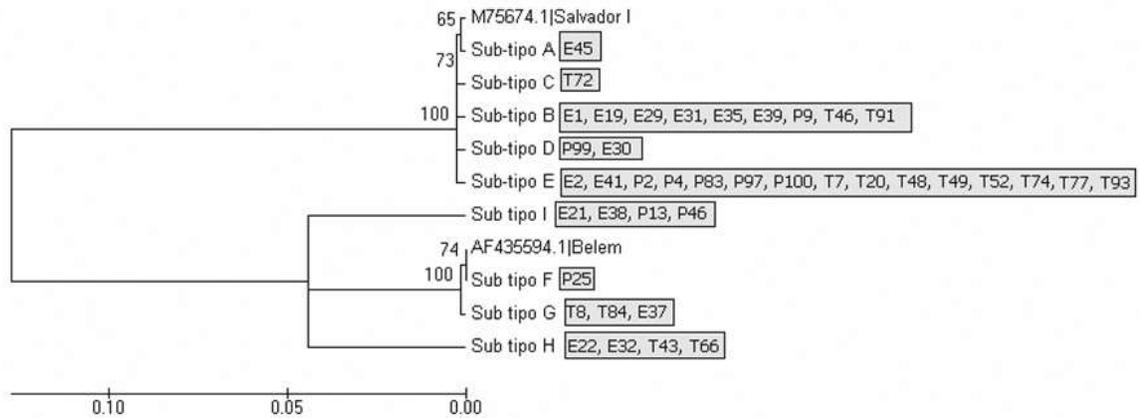


Figura 6: Árbol de distancia de los subtipos identificados para el gen MSP1D5, a partir de secuencias de 429 nucleótidos. Se incluyen las secuencias reportadas para los aislados Salvador I y Belem (Acc. No.M75674.1 y AF435594.1, respectivamente). Las muestras pertenecientes a cada sub-tipo se muestran en gris y los códigos corresponden a P=Petén, T=Escuintla y E=Izabal. Método de inferencia del árbol: *Neighbor-Joining*; modelo de sustitución: nucleótida Tamura-Nei; *bootstrap* 5,000 réplicas.

En la Tabla 2 se muestran las frecuencias para cada uno de los subtipos para cada gen. La mayor frecuencia se reporta para el sub-tipo E del gen CSP, mientras que para los genes de la MSP1 se reportan valores similares en la frecuencia de los subtipos más abundantes D y E para las regiones ICB2-3 e ICB5-6, respectivamente.

Sub-tipo	Frecuencia		
	CSP	MSP1 ICB2-3	MSP1 ICB5-6
A	0.0588	0.1290	0.0250
B	0.1765	0.1290	0.2250
C	0.0588	0.1290	0.0250
D	0.0588	0.3226	0.0500
E	0.5294	0.2903	0.3750
F	0.0588		0.0250
G	0.0588		0.0750
H			0.1000
I			0.1000

Tabla 2: Frecuencia de cada sub-tipo en las muestras analizadas. En gris se indica el sub-tipo con mayor frecuencia para cada gen marcador.

Discusión

Estudios genéticos realizados en parásitos de *Plasmodium vivax* alrededor del mundo han mostrado que dentro de esta especie pueden distinguirse variantes del parásito que le confieren características particulares, asociadas a factores epidemiológicos, clínicos y biológicos relevantes para la prevención, control y tratamiento de la malaria. Dentro de los factores clínicos puede mencionarse la asociación que se ha encontrado entre la variante genética del parásito y el tiempo de activación del mismo dentro de las células hepáticas (13), los síntomas de la enfermedad que producen y el tiempo requerido para eliminar los parásitos de la sangre (15). En cuanto a la dinámica de transmisión de la enfermedad, se ha demostrado que existe transferencia diferencial de determinadas variantes del parásito por parte de algunas especies de mosquitos anofelinos (14). También se ha encontrado que la respuesta de los parásitos al tratamiento con cloroquina tiene asociación con la variante de los mismos (16).

Para el estudio de estas asociaciones en nuestro país es necesario, inicialmente, identificar si existen variantes genéticas del parásito en las áreas endémicas para malaria, ya que hasta el momento se contaba con información muy limitada (De Urioste, datos no publicados), la cual fue obtenida de muestras procedentes únicamente del sur del país (Tiquisate, Escuintla). El principal objetivo de este estudio fue determinar si existe diversidad genética dentro de la población de parásitos de *Plasmodium vivax* circulantes en las principales áreas endémicas para malaria en el país, utilizando genes marcadores empleados a nivel internacional.

Para obtener el material genético del parásito, se decidió utilizar muestras de sangre de pacientes sintomáticos colectadas en lámina de gota gruesa y teñidas con Giemsa, ya que es el método rutinario empleado por el Ministerio de Salud Pública de Guatemala para el diagnóstico microscópico de la malaria. La metodología de extracción del ADN del parásito fue estandarizada en estas muestras con la finalidad de contribuir a facilitar la futura implementación de tecnologías moleculares a nivel nacional, sin tener que invertir tiempo en capacitación adicional del personal y materiales más costosos, como lo demandan otros métodos de colecta de muestras para estudios genéticos de esta naturaleza.

Con el material genético colectado, se realizó una evaluación preliminar de la utilidad de seis genes que codifican para proteínas de superficie de *P. vivax*, utilizados a nivel mundial para estudios de diversidad, obteniéndose amplificación en más del 70% las muestras para los genes CSP, MSP1 ICB2-3 y MSP1 ICB5-6. Los restantes genes marcadores (AMA-1, MSP3_ y MSP3β) no fueron incluidos en el estudio por los bajos porcentajes de amplificación encontrados. Estos bajos porcentajes pueden deberse a que los iniciadores utilizados para la amplificación de dichos genes fueron diseñados para cepas de *P. vivax* procedentes de otras regiones geográficas del mundo, principalmente Asia, las cuales posiblemente difieren genéticamente de los parásitos circulantes en nuestro país.

Esto pone de manifiesto la necesidad de desarrollar nuevos genes marcadores, pero partiendo de material genético de parásitos de la región.

En relación al gen para la CSP, a pesar que estudios de diversidad genética de *P. vivax*

a nivel mundial, han reportado la presencia de las variantes VK210 y VK247, y que estudios previos (Padilla, datos no publicados) realizados en el norte del país mostraron la presencia de las dos variantes de la proteína en parásitos que se encuentran infectando mosquitos anofelinos, vectores de la enfermedad, en este estudio se encontró que todas las muestras analizadas pertenecen a la variante VK210. Esto sugiere que posiblemente las especies de anofelinos responsables de la transmisión de la malaria en las regiones estudiadas son refractarios a los parásitos de *P. vivax* VK247, los cuales son destruidos en alguna de las etapas de desarrollo del parásito dentro del vector. Sin embargo, es necesario analizar un mayor número de muestras de todas las áreas maláricas de Guatemala para poder confirmar la ausencia real de la variante VK247 en hospederos humanos y evaluar iniciadores para amplificar este gen, diseñados con cepas locales, para poder descartar la posibilidad que una variación genética sea la responsable de la falta de amplificación del gen.

Dentro de los 7 sub-tipos identificados para el gen de la CSP, la mayoría de las muestras (53%) pertenece al sub-tipo E, 18% al sub-tipo B y 6% a cada uno de los restantes sub-tipos. Todos los subtipos identificados corresponden a aislados ya identificados para *P. vivax*, a excepción de una muestra procedente de El Estor, Izabal (sub-tipo G) que mostró una sustitución no sinónima en la secuencia de este gen, que conlleva al cambio de una prolina por una alanina en la estructura primaria de esta proteína. Dado que esta sustitución se observó únicamente en una muestra, es necesario analizar mayor número de muestras de esta región para confirmar su presencia y determinar su

prevalencia en la población de parásitos, y su posible asociación con factores epidemiológicos y clínicos de la enfermedad.

Para el gen MSP1 ICB2-3 se identificaron 5 subtipos, todos correspondientes a aislados reportados previamente. El 32% de las muestras corresponde al sub-tipo D, el 29% al sub-tipo E y el 13% a cada uno de los otros sub-tipos identificados.

El sub-tipo A que muestra ser un producto de la recombinación entre los aislados TC103 y TG46, presenta mutaciones no sinónimas que dan origen a un cambio en la secuencia de cuatro aminoácidos en el extremo 3' de la región amplificada.

Estas mutaciones no se observaron en ninguno de los otros sub-tipos identificados. Nuevamente, es necesario analizar mayor número de muestras para determinar la prevalencia de estas mutaciones en el país y su posible asociación con factores epidemiológicos y clínicos de la enfermedad. A diferencia de la mutación encontrada para la CSP, las mutaciones en este gen fueron identificadas en muestras procedentes de las tres regiones maláricas analizadas, lo que sugiere una mayor distribución geográfica de la misma.

En cuanto al gen MSP1 ICB5-6 se encontraron nueve sub-tipos en las muestras analizadas, de las cuales 70% (agrupadas en 5 sub-tipos) corresponden al tipo Salvador I, el 20% (2 sub-tipos) al tipo Belem y el 10% (2 sub-tipos) a un recombinante entre ambas. Además de presentar mayor diversidad que los otros genes estudiados, también mostró presencia de mutaciones en todos los sub-tipos identificados, producto de sustituciones no-sinónimas y/o inserciones. La mayoría de las muestras pertenecen al sub-tipo E. Es interesante

mencionar que la muestra E32, procedente del departamento de Izabal mostró mutaciones en los tres genes analizados, mientras que la muestra T43 de Escuintla mostró mutaciones en dos, lo que sugiere que en las regiones sur y nor-este del país existen factores que influyen en que las poblaciones de parásitos muten para adaptarse mejor a su medio ambiente.

Para poder determinar la prevalencia de las variantes de *P. vivax* en el país, es necesario abarcar más regiones y analizar mayor número de muestras. Sin embargo, este estudio provee datos importantes respecto a las variantes de esta especie, responsable de la mayor cantidad de casos de malaria en el país, y permitirá en un futuro poder determinar si las vacunas para malaria, que se están desarrollando a nivel internacional, tienen posibilidades de conferir protección contra las poblaciones de parásitos presentes en Guatemala.

Conclusiones

- Todos los aislados de *P. vivax* provenientes del norte, nor-este y sur de Guatemala constituyen un grupo de siete subtipos pertenecientes al tipo CSP VK210. Las variaciones entre subtipos fueron encontradas en el número y tipo de unidades repetitivas GDRAAGQPA y GDRADGQPA. El sub-tipo E fue el más frecuente (9/17 muestras), y es similar al aislado Belem.
- Las muestras analizadas para el gen MSP1 ICB2-ICB3 forman un grupo de cinco diferentes subtipos. La mayoría de las muestras pertenecen a los subtipos D (10/31) y E (9/31), ambos semejantes a los aislados brasileños BR44 y BP30, respectivamente.
- Se identificaron nueve subtipos para el gen MSP1 ICB5-ICB6, todos similares a los aislados Salvador I, Belem o un recombinante entre ellos. La mayoría de las muestra (28/40) fueron semejantes al tipo Salvador I. Los subtipos semejantes al aislado Belem mostraron diferente número de repeticiones poli-Q, en un rango entre 18 y 26 residuos.

Reconocimiento

Este trabajo forma parte del Proyecto No.22-2003 "Diversidad genética de *Plasmodium vivax* en regiones de alto riesgo de malaria en Guatemala", financiado por la línea FODECYT, del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONCYT.



Lic. Renata Mendizábal-Cabrera
rmcz@cdc.gov
Investigador del Centro de Estudios
en Salud del Instituto de
Investigaciones de la Universidad del
Valle de Guatemala

Dra. Norma Padilla
npcz@cdc.gov
Investigador del Centro de Estudios
en Salud del Instituto de
Investigaciones de la Universidad del
Valle de Guatemala

Bibliografía

1. Greenwood, B. *The molecular epidemiology of malaria* Trop Med Intl Health 7 (12): 1012-1021, 2002
2. Cui, L. et al. *The genetic diversity of Plasmodium vivax populations* TRENDS in Parasitol 19 (5): 220-226, 2003
3. Rich, S.M. et al. *Malaria's Eve: Evidence of a recent population bottleneck throughout the world populations of Plasmodium falciparum* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 4425-4430, 1998
4. Gordon, D.M. et al. *Safety and immunogenicity of a Plasmodium vivax sporozoite vaccine* Am J Trop Med Hyg 42: 527-531, 1990
5. Rosenberg, R. et al. *Circumsporozoite protein heterogeneity in the human malaria parasite Plasmodium vivax* Science 245: 973-976, 1989
6. Kain, K.C. et al. *Serologic and genetic characterization of Plasmodium vivax from whole blood-impregnated filter paper discs* Am J Trop Med Hyg 46 (4): 473-479, 1992
7. Del Portillo, H. et al. *A superfamily of variant genes encoded in the subtelomeric region of Plasmodium vivax* Nature 410 (6830): 839-842, 2001
8. Figtree, M. et al. *Plasmodium vivax synonymous substitution frequencies, evolution and population structure deduced from diversity in AMA 1 and MSP 1 genes* Mol Biochem Parasitol 108: 53-66, 2001
9. Cheng, Q. et al. *Polymorphism in Plasmodium vivax MSA1 gene--the result of intragenic recombinations?* Parasitol 106: 335-345, 1993
10. Gutiérrez, A. et al. *Plasmodium vivax: polymorphism in the merozoite surface protein 1 gene from wild Colombian isolates* Exp Parasitol 95(3):215-219, 2000
11. Edoh, D. S. et al. *PCR amplification of DNA from malaria parasites on fixed and stained thick and thin blood films* Trans R Soc Trop Med Hyg 91 (3): 361-363, 1997
12. Snounou, et al. *Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections* Mol Biochem Parasitol 58 (2): 283-292, 1993
13. Garnham et al. *A strain of Plasmodium vivax characterized by prolonged incubation: morphological and biological characteristics* Bull World Health Organ 52 (1): 21-32, 1975
14. González-Cerón et al. *Plasmodium vivax: ookinete destruction and oocyst development arrest are responsible for Anopheles albimanus resistance to circumsporozoite phenotype VK247 parasites* Exp Parasitol 98 (3):152-61, 2001
15. Dantas Machado, R.L. et al. *Correlation between Plasmodium vivax variants in Belém, Pará State, Brazil and symptoms and clearance of parasitaemia* Braz J Infect Dis 7 (3):175-177, 2003
16. Kain, K.C et al. *Response of Plasmodium vivax variants to chloroquine as determined by microscopy and quantitative Polymerase Chain Reaction.* Am J Trop Med Hyg 49(4):478-484, 1993