



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

MICROEPIDEMIOLOGÍA Y HETEROGENEIDAD ESPACIAL DE
LAS PARASITEMIAS POR *PLASMODIUM VIVAX* EN
COMUNIDADES RURALES DE LA AMAZONÍA PERUANA: UN
ANÁLISIS MULTINIVEL

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS EN INVESTIGACIÓN EPIDEMIOLÓGICA

GABRIEL CARRASCO ESCOBAR

LIMA - PERÚ

2017

MIEMBROS DEL JURADO

Presidente

Jesús Chirinos Cáceres

Vocal

César Cárcamo Cavagnaro

Secretario

José Luis Rojas Vilca

ASESOR

Andrés G. Lescano Guevara

AGRADECIMIENTOS

Dionicia Gamboa Vilela, PhD.

Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Alejandro Llanos Cuentas, MD, PhD.

Facultad de Salud Pública y Administración, Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Joseph Vinetz, MD.

School of Medicine, University of California, San Diego

DEDICATORIA

Para Kelly y Santiago.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	9
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
OBJETIVOS	11
MÉTODOS	12
Área de estudio y población	12
Diseño de estudio y selección de comunidades	12
Recolección de Datos	13
Procedimientos de Laboratorio	14
Análisis Espacial	15
Variables y Análisis Estadístico.....	16
Consideraciones Éticas.....	18
RESULTADOS	18
Características socio-demográficas y de viviendas	18
Prevalencia parasitaria de malaria	19
Agrupaciones espaciales de parasitemias por <i>P. vivax</i> en viviendas	20
Análisis multinivel de la prevalencia parasitaria por <i>P. vivax</i>	21
DISCUSIÓN	22
CONCLUSIONES	29
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
TABLAS Y FIGURAS	38
Tabla 1. Características basales de la población de estudio.....	38
Tabla 2. Prevalencia parasitaria de malaria (por microscopia and PCR) por muestras e individuos.	40
Tabla 3. Efectos fijos de los modelos multi-comunidad y comunidad-específico bivariados de parasitemia por <i>P. vivax</i>	41
Tabla 4. Efectos fijos del modelo multi-comunidad multivariado de parasitemias por <i>P. vivax</i> . 42	
Tabla 5. Efectos fijos de los modelos comunidad-específicos multivariados de parasitemias por <i>P. vivax</i>	43
Figura 1. Área de estudio en el distrito de Mazan, Departamento de Loreto, Amazonía Peruana. Distribución espacial de las comunidades de Gamitanacocha (GC, círculos verdes), Libertad (LI, círculos azules), Primero de Enero (PE, círculos amarillos) and Urco Miraño (UM, círculos rojos) en el distrito de Mazan.	44
Figura 2. Distribución de las parasitemias por <i>P. vivax</i> y prevalencia parasitaria a lo Larco de las 4 encuestas DAC. a) Número de individuos con parasitemias de <i>P. vivax</i> nuevas (barras gris claro), detectadas previamente (barras gris oscuro) y acumuladas (cuadrados celestes); y b) prevalencia parasitaria por microscopia (línea discontinua ploma) y qPCR	

(línea continua negra); y la proporción de parasitemias sub-microscópicas (SM, barras celestes) en cada encuesta DAC.	45
Figura 3. Proporción de participantes por vivienda con al menos una parasitemia por <i>P. vivax</i> a lo largo del seguimiento en: Gamitanacocha (GC), Libertad (LI), Primero de Enero (PE) y Urco Miraño (UM).	46
Figura 4. Análisis de agrupamiento por indicadores locales de asociación espacial (LISA) de las parasitemias por <i>P. vivax</i> en: Gamitanacocha (GC), Libertad (LI), Primero de Enero (PE) y Urco Miraño (UM).	47
MATERIAL SUPLEMENTARIO	48
Tabla Suplementaria S1. Destinos comunes de registros de viajes auto-reportados por habitante de Gamitanacocha (GC), Libertad (LI), Primero de Enero (PE), and Urco Miraño (UM). 48	
Tabla Suplementaria S2. Efectos aleatorios de modelo multi-comunidad nulo y modelo multivariado para parasitemia por <i>P. vivax</i>	49
Tabla Suplementaria S3. Efectos aleatorios de modelos comunidad-específicos nulo y modelo multivariado para parasitemia por <i>P. vivax</i>	50
Figura Suplementaria S1. Estructura multinivel de datos recolectados en el estudio	52

RESUMEN

En los últimos cinco años, la malaria se ha incrementado de forma constante en la Amazonía Peruana. Este estudio busca determinar la heterogeneidad micro-geográfica de las parasitemias por *Plasmodium vivax* en comunidades rurales de la Amazonía Peruana. Cuatro encuestas transversales de detección activa de casos (DAC) fueron realizadas entre Mayo y Julio del 2015 en cuatro comunidades rurales del distrito de Mazán. La detección de agrupaciones (clústers) de parasitemias por *P. vivax* dentro de las comunidades fue determinada mediante el análisis de Anselin's Local Moran's *I* (LISA) y se utilizaron modelos de regresión de Poisson multinivel para evaluar si los factores asociados con parasitemias por *P. vivax* varían a un nivel micro-geográfico, con dos aproximaciones: 1) incluyendo todas las comunidades y términos de interacción (multi-comunidad) y 2) un modelo por cada comunidad (comunidad-específico). Se analizaron 2785 muestras de 820 individuos ubicados en 154 hogares para la identificación de parasitemias por *P. vivax* y *P. falciparum* en base a microscopia y qPCR. Del total de individuos enrolados, 47% tuvo al menos una parasitemia por *P. vivax* y 10% por *P. falciparum* determinados por qPCR. En ambos casos las parasitemias eran predominantemente sub-microscópicas y asintomáticas. El análisis de LISA detectó clústers significativos en tres de las cuatro comunidades (Moran's *I* > 0.02; rango valor-p = 0.001 – 0.05). Los modelos de regresión multi-comunidad y comunidad-específicos mostraron diferencias en los factores de riesgo entre las comunidades de estudio. Los factores donde se observó modificación de efecto de acuerdo a la comunidad fueron la ocupación (Razón de prevalencias ajustada - RPA > 1.36; rango valor-p = 0.04 – 0.05) y movilización de los habitantes (RPA > 2.93; rango valor-p = 0.01 – 0.03). Se observó que los patrones de agrupación espacial de parasitemias por *P. vivax* difieren entre comunidades con diferentes perfiles de movilización relacionadas al trabajo. Nuestros hallazgos de que todas las comunidades tuvieron prevalencias de *P. vivax* por encima del 25% al cabo de cuatro encuestas transversales cuestionan la clasificación tradicional de la Región Amazónica Peruana como área hipo-endémica para la transmisión de malaria. La heterogeneidad de *P. vivax* observada en el estudio parece estar relacionada a la movilización de la población entre comunidades en la misma micro-cuenca, un aspecto clave y poco estudiado para el control de malaria en la Amazonía Peruana y que se puede atender en futuras estrategias para la eliminación de la malaria.

ABSTRACT

Malaria has steadily increased in the Peruvian Amazon over the last five years. This study aimed to determine the parasite prevalence and micro-geographical heterogeneity of *Plasmodium vivax* parasitemia in rural communities of the Peruvian Amazon. Four cross-sectional active case detection (ACD) surveys were conducted between May and July 2015 in four riverine communities in Mazan district. Spatial clusters of *P. vivax* parasitemias were determined by Anselin's Local Moran's I analysis (LISA). Multilevel Poisson regression models were used to evaluate if associated factors to *P. vivax* parasitemias vary at micro-geographical level using two approaches: 1) including all communities (multi-community) and 2) a standalone model for each community (community-specific). Analysis of 2785 samples of 820 individuals nested within 154 households for *P. vivax* and *P. falciparum* parasitemias was carried out using light microscopy and qPCR. Of enrolled individuals, 47% had at least one *P. vivax* parasitemia and 10% *P. falciparum*, by qPCR, both of which were predominantly sub-microscopic and asymptomatic. Spatial analysis detected significant clustering in three communities (Moran's $I > 0.02$; p-value range= 0.001 – 0.05). Multi-community and community-specific multilevel Poisson regression models showed differences in associated factors across communities. Effect modification accordingly to community was observed on occupation (Adjusted Prevalence Ratio - APR>1.36; p-value range= 0.04 – 0.05) and human mobilization (APR>2.93; p-value range= 0.01 – 0.03). We observed different spatial clustering patterns of *P. vivax* parasitemias in communities with specific occupational-related mobility profiles. Our findings that all communities have a *P. vivax* prevalence higher than 25% in one-month period challenge the traditional classification of the Peruvian Amazon region as hypoendemic for malaria transmission. The observed heterogeneity might be related to human population movement among communities in the same micro-basin, a key and neglected aspect of malaria control that need to be addressed in future malaria elimination strategies.

INTRODUCCIÓN

El progreso en reducir la incidencia y mortalidad de la malaria en la última década ha sido significativo a nivel mundial, sin embargo existen aún desafíos claves que se mantienen, particularmente con un énfasis global en la eliminación de malaria ^{1,2}. De acuerdo a datos posteriores a la Segunda Guerra Mundial, la transmisión de malaria en el Perú ha estado dominada por *Plasmodium vivax*. Desde de la década de 1990, *P. falciparum*, junto con *P. vivax*, han emergido como epidemias principales, con brotes continuos e incremento de incidencias que continúan hasta el presente ³⁻⁶. En la última década, cinco años (2005-2010) de financiamiento del Fondo Mundial para la lucha contra el VIH/Sida, Tuberculosis y Malaria (Programa para el Control de la Malaria en las Zonas Fronterizas de la Región Andina – PAMAFRO) fueron utilizados para ampliar estrategias de control integral que incluían la mejora del diagnóstico oportuno y tratamiento de casos de malaria en áreas endémicas, fortalecimiento del sistema de servicios de salud, entrenamiento a promotores de salud y microscopistas, y distribuir mosquiteros tratados con insecticida y gestión ambiental a través de participación comunitaria ⁶⁻⁸. Como resultado, el número de casos de malaria reportados por detección pasiva en el 2010 fue el más bajo en las dos últimas décadas (11,604 casos).

Desde entonces, las actividades de control han sido delegadas como responsabilidad exclusiva de la Dirección Regional de Salud de Loreto (DRSL) del Ministerio de Salud, priorizando la detección pasiva y reactiva de casos usando microscopía óptica estándar y tratando infecciones confirmadas, representando así, la descentralización de dichas actividades. Sin embargo, focos residuales de transmisión con nuevas infecciones, relapsos de infecciones previas por hipnozoitos adquiridos en un tiempo distante, cambios en el comportamiento y poblaciones del vector ^{9,10} *Anopheles darlingi* (vector principal para ambas especies de parásitos de malaria en Perú) ^{11,12}, reservorios de infecciones submicroscópicas ^{13,14}, factores relacionados al clima (como inundaciones en el departamento de Loreto en los últimos años) y el persistente gran esfuerzo que demanda para la poblaciones rurales dispersas para acceder a los servicios de salud, han contribuido al incremento del número de infecciones reportadas desde 2011, principalmente en el departamento de Loreto ^{3,15}. Ubicado en la región Amazónica, el departamento de Loreto cubre el 28.7% (386,51 Km²) del total del territorio Peruano, abarcando el 3.3% (1'018,160 hab.) del total de la población de Perú ¹⁶, y representando el 95% de la carga de malaria a nivel nacional. A pesar de que se ha reportado que la transmisión de malaria es perenne en la Amazonía peruana, con una temporada de alta transmisión entre noviembre y junio ⁵,

datos de la DRSL sugieren que Loreto tiene una distribución espacio-temporal de malaria bastante heterogénea ³.

En este contexto, es posible distinguir grupos con alto riesgo de malaria ¹⁷. Espacialmente, infecciones agrupadas a un nivel hogar pueden revelar clústers de hogares donde el riesgo de infección de malaria es más alto en comparación con el resto de la comunidad ¹⁸⁻²¹. La detección de estos clústers de alto riesgo puede ayudar a enfocar los esfuerzos de control de malaria ^{18,22-24}. Más importante, desde la perspectiva de medidas de control de salud pública, los clústers deben ser identificados sin importar la sintomatología o densidad parasitaria de los portadores, debido a que la inmunidad adquirida por los habitantes de los clústers ²⁵⁻²⁹, y la clonalidad de los parásitos de malaria en la región Amazónica ³⁰⁻³⁴, genera una mayor proporción de infecciones indetectables (sub-microscópicas) que, por su falta de síntomas, no recibirían tratamiento. En este escenario, se esperaría observar diferentes patrones de agregación espacial para los casos de malaria (esto es, parasitemia acompañada de síntomas) y parasitemia por malaria (con o sin síntomas) ¹⁹.

La biología particular de *P. vivax* incluye un estadio inactivo en el hígado (i.e. hipnozoítos) que se mantiene indetectable hasta que mecanismos aún desconocidos ³⁵ activan el ciclo del parásito y causan la reactivación de la infección original ³⁶. De manera importante, el tratamiento de *P. vivax* en el Perú está basado en un régimen de 7 días de primaquina (PQ) de 0.5mg/kg/día. Sin embargo, este régimen no es normalmente supervisado y se ha reportado una tasa de adherencia del 62% ³⁷. Herramientas para distinguir entre tipos de recurrencias aún están en desarrollo ³⁸⁻⁴¹. Las recurrencias de malaria por *P. vivax* son ocasionadas por infecciones nuevas (a partir de una nueva picadura del mosquito), recaídas por reactivación de hipnozoítos (denominado en adelante como “relapso”) o fallas al tratamiento ⁴². Por lo tanto, en este trabajo el término parasitemia se utiliza para indicar la presencia de parásitos de *Plasmodium* circulando en la sangre, como sugiere la Organización Mundial de la Salud ⁴³, sin tomar en cuenta el origen desde una nueva infección o relapso de hipnozoítos, bajo el supuesto que ambos son probablemente equivalentes en términos del potencial de transmisión’ ⁴⁴.

En los últimos años, algunos estudios han demostrado una alta heterogeneidad espacial en las prevalencias de *P. vivax* y *P. falciparum* a nivel microgeográfico ⁴⁵⁻⁴⁷. Sin embargo, poco ha sido explorado en términos de los factores que influyen esta heterogeneidad. Otras disciplinas, como análisis espacio-temporales, específicamente en regresiones espaciales,

se ha acuñado el término 'proceso espacial no-estacionario' para referirse a una estimación global del factor de riesgo que puede resultar inapropiada ya que promedia relaciones que no son transferibles a todos los contextos locales. En este contexto este estudio busca explorar las heterogeneidades de *P. vivax* intra-comunidad y entre-comunidades así como determinar las diferencias en los factores de riesgo que pueden ocasionar este fenómeno.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Estudios previos en comunidades cercanas a Iquitos (capital del departamento de Loreto) muestran una moderada heterogeneidad espacial y micro-epidemiológica de la transmisión de malaria, ambos en términos de incidencia de la enfermedad y prevalencia parasitaria^{14,48,49}. No obstante, la dinámica compleja de la transmisión de la malaria en comunidades rurales -el contexto típico de malaria en la Amazonía- requiere una identificación precisa de estos clústers de alto riesgo de parasitemia por *P. vivax* y los factores asociados a nivel persona, hogar y comunidad para mejorar la implementación de estrategias de intervención en estos clústers de transmisión^{22,50,51}. Este estudio busca determinar la heterogeneidad de los factores de riesgo de la parasitemia por *P. vivax* entre comunidades rurales de la Amazonía Peruana, tomando en cuenta el agrupamiento de malaria dentro de hogares y dentro de comunidades. Así, un análisis espacial y multinivel se llevó a cabo usando información espacial en cuatro comunidades rurales de la Región Amazónica del Perú.

OBJETIVOS

Principal

Determinar la heterogeneidad de los factores de riesgo de parasitemias por *P. vivax*, en términos de modificación de efecto en cuatro comunidades rurales de la Amazonía Peruana.

Secundarios

- Determinar la prevalencia de parasitemias por *P. vivax* en cuatro comunidades rurales de la Amazonía Peruana.
- Determinar la heterogeneidad espacial de parasitemias por *P. vivax* en cada una de las cuatro comunidades rurales de la Amazonía Peruana.
- Determinar la heterogeneidad en las prevalencias de parasitemias por *P. vivax* entre las cuatro comunidades rurales de la Amazonía Peruana.

MÉTODOS

Área de estudio y población

El presente estudio se llevó a cabo en el distrito de Mazán (Norte de Iquitos), provincia de Maynas en el departamento de Loreto. La población es principalmente mestiza, muy pobre y viven en casas de madera semi-abiertas sin divisiones. La economía local depende de la agricultura, maderería y pesca. El clima es tropical con temperaturas mínimas de 17°C a 20°C en los meses de diciembre a marzo, y temperaturas máximas de hasta 36°C en junio y julio. El promedio de humedad es 84% con fuertes lluvias desde noviembre hasta mayo^{5,52}. El distrito de Mazán se compone de pequeñas comunidades y la capital y comunidad más grande es la comunidad de Mazán (3.503° S, 73.094° W), localizado cerca de la confluencia de los ríos Mazán y Napo, a unos 55km - 60km de la ciudad de Iquitos (1 hora en bote).

La transmisión de malaria en el distrito de Mazán tiene un patrón epidemiológico inestable y estacional, con picos entre mayo y septiembre. El vector principal es el *Anopheles darlingi*, altamente antropofílico¹⁰ y cerca del 85% de los casos de malaria reportados por la DRSL son causados por *P. vivax* (el resto son exclusivamente por *P. falciparum*) distribuidos entre todas las edades. Mazán es considerado un distrito de alto riesgo para transmisión de malaria, 1954 casos fueron reportados en el 2014, indicando un índice anual parasitario (IAP) de 141.1 casos por 1000 habitantes.

Diseño de estudio y selección de comunidades

La presente investigación es de tipo analítico retrospectivo que utiliza datos previamente colectados de un estudio de serie de encuestas transversales a nivel poblacional realizado en mayo del 2015. En el estudio primario (SIDISI: 64371) se realizó un censo completo y geo-localización de viviendas en marzo 2015 en diez comunidades con alto riesgo de malaria (según los datos históricos de DRSL) del distrito de Mazán. De marzo a abril del 2015, estas comunidades estuvieron bajo vigilancia semanal para detectar comunidades donde pueda ocurrir un incremento inusual de casos. La vigilancia se basó en monitorear la tasa de positividad de la lámina (TPL) de detección pasiva de casos (DPC) de la DRSL. Las comunidades estudiadas fueron seleccionadas en base a dos criterios: a) la proporción de la población examinada para malaria (gota gruesa y frotis) fue mayor al 20% en las 8 semanas previas, y b) la TPL de las 8 semanas previas se mantuvo por encima al 5% durante

dos semanas consecutivas. Estos criterios resultaron en la selección de cuatro comunidades (Fig. 1): Gamitanacocha (GC - 3.426° S, 73.318° W), Libertad (LI - 3.496° S, 73.234° W), Primero de Enero (PE - 3.494° S, 73.221° W) y Urco Miraño (UM - 3.361° S, 73.064° W).

Subsecuentemente, cuatro encuestas transversales de detección activa de casos (DAC) se realizaron entre mayo y julio del 2015 en cada una de las cuatro comunidades, una encuesta DAC cada 10 días. Para determinar factores de riesgo y heterogeneidades en los factores de riesgo para *P. vivax* entre comunidades tomando en cuenta los diferentes niveles de agrupación de la malaria, se llevó a cabo un análisis espacial y multinivel.

Recolección de Datos

En el censo del estudio primario, cada vivienda de la comunidad fue codificada (código con 6 dígitos) y geo-referenciada usando un dispositivo manual de Sistema de Posicionamiento Global (GPS) (Garmin's GPSMAP 60CSx, Garmin International Inc., USA). Todos los miembros de cada vivienda fueron invitados a participar y, una vez firmado el consentimiento, se asignó un código único de 8 dígitos a cada participante. Se utilizó un cuestionario estructurado que fue probado previamente en un piloto para recolectar datos de individuos y viviendas (edad, género, características socioeconómicas, actividades laborales y recreacionales, historial de malaria, uso de medidas preventivas, posesión de animales, características estructurales de la casa, servicios en la vivienda, etc.)

En cada encuesta de DAC, datos sobre características socio-demográficas y manifestaciones clínicas auto-reportadas fueron recolectados. Cada participante fue examinado clínicamente para fiebre o cualquier otro síntoma de malaria. Se recolectaron muestras de sangre de cada miembro de la vivienda por gota gruesa para examinación microscópica (láminas de gota gruesa y frotis) y para diagnóstico por PCR (muestra de sangre en papel filtro - Whatman grade 3, Whatman, Springfield Mill, USA). Para evitar la contaminación de las muestras de sangre en campo, se designó un área en la vivienda donde colocar los materiales de colección de muestra. Esta área fue decontaminada previamente al llamado de cada participante. Cada una de las muestras fue almacenada de forma independiente en contenedores distintos y los materiales de bioseguridad fueron desechados según procedimientos estándares del Instituto de Medicina Tropical "Alexander von Humboldt" (IMT-AvH). Las muestras de sangre fueron codificadas durante el trabajo de campo con etiquetas previamente impresas con códigos de 9 dígitos. Este código fue utilizado en el trabajo de campo y en el IMT-AvH en Lima, donde las muestras fueron

procesadas. Nuevos participantes fueron enrolados durante las encuestas de DAC. Los participantes con diagnóstico de malaria por microscopía en las encuestas de DAC fueron tratados siguiendo las guías nacionales.

Durante el censo y las encuestas DAC, las casas fueron visitadas hasta 3 veces en un período de 3 días para maximizar la participación de los habitantes. Los datos fueron recolectados usando Open Data Kit (ODK) ^{53,54} en dispositivos móviles sin conexión a internet. Los datos fueron sincronizados con el servidor del proyecto en Lima, y vinculados a resultados en el laboratorio usando los códigos únicos de 9 dígitos.

Procedimientos de Laboratorio

Microscopía

Como parte del proyecto primario, la examinación por microscopía se llevó a cabo el mismo día en que se recolectó la muestra en cada encuesta DAC. La gota gruesa y el frotis fueron teñidos con solución Giemsa al 10% por 10 minutos y fueron examinados para determinar la densidad parasitaria, contando el número de parásitos en estado asexual y gametocitos por 200 leucocitos (L) y asumiendo una concentración de 800 L/ μ l de sangre. Una muestra fue considerada negativa si no se detectaba parásitos de malaria luego de examinar 100 campos de microscopía ⁵⁵. Se realizó un control de calidad a ciegas en todas las láminas positivas y 10% de las negativas escogidas aleatoriamente por un técnico profesional del IMT-AvH.

PCR Cuantitativa en Tiempo Real (qPCR)

Las áreas de papel filtro que contenían sangre fueron cortadas en secciones de ~ 6 mm² para la extracción del ADN genómico del parásito usando E.Z.N.A.® Blood DNA Kit (Omega Bio-tek®, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante con ligeras modificaciones – sumando una solución TEN (20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 2 mM EDTA, pH 8.0; 0.2 M NaCl), complementado con SDS 10% w/v - y almacenado a 4° C para uso inmediato y a -20 ° C para su posterior análisis.

El diagnóstico por Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa en Tiempo Real (qPCR) fue hecho siguiendo un protocolo modificado de Mangold et al. ⁵⁶ usando PerfeCta SYBR Green Fast Mix (Quanta Biosciences, MD, USA). Brevemente, este método amplifica la secuencia del gen del 18SSU rRNA de la región específica por especie de Plasmodium.

Después de la amplificación, el análisis de las diferencias en las curvas de temperatura proporciona una diferenciación precisa entre las especies de *Plasmodium*.

Análisis Espacial

Para determinar si existe autocorrelación espacial de parasitemias por *P. vivax* en el área de estudio, se llevó a cabo el análisis de Anselin's Local Moran's I (un tipo de Indicador Local de Asociación Espacial – LISA), y se realizó una corrección para pruebas múltiples y dependientes usando la tasa de falsos descubrimientos (FDR-por sus siglas en inglés) ^{57,58}. Este análisis se realizó utilizando la proporción de individuos con parasitemia por *P. vivax* a un nivel hogar como variable dependiente. Los datos de series de tiempo para cada participante se consolidaron en un solo registro definido como al menos una parasitemia por *P. vivax* (resultado positivo por qPCR) durante las 4 encuestas DAC. Se utilizó QGIS 2.16 (QGIS Development Team, 2016. QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project) para el procesamiento y visualización de datos espaciales.

Brevemente, LISA identifica relaciones significativas entre los valores en la vivienda índice (*i*) y los valores en un conjunto de casas cercanas, o vecindario (*ij*) con la siguiente fórmula:

$$I_i = z_i \sum_j w_{ij} z_j \quad (1)$$

Donde z_i es la proporción de *P. vivax* en la vivienda índice y $\sum_j w_{ij} z_j$ es la proporción ponderada de *P. vivax* en el vecindario. Estos vecindarios fueron definidos de forma ponderada a la distancia entre viviendas en GeoDa v1.8 (Luc Anselin, 2016, USA) ⁵⁹. Dos factores guiaron el criterio para escoger el umbral de distancia para los vecindarios. El primero fue el rango de vuelo de los mosquitos en la región amazónica. El rango de vuelo más largo reportado del *An. darlingi* es 7.2km ⁶⁰ en la Amazonía Brasileira, pero la mayoría de mosquitos vuelan dentro de 400-500m ^{61,62} desde su criadero. En segundo lugar, en estas comunidades, vecindarios superiores a 2.000 m cubren toda la comunidad. Se realizó un análisis no paramétrico de autocorrelación espacial en GeoDa para evaluar los umbrales de distancia del vecindario. Se probaron distancias desde 100m a 2.000 m y una distancia de 550m mostró el máximo nivel de autocorrelación espacial. Esta distancia fue usada en el análisis de LISA para identificar relaciones significativas entre la proporción de *P. vivax* en las viviendas y la proporción de *P. vivax* en los vecindarios en cada comunidad como: clúster de alto riesgo (Alto-Alto), donde ambas proporciones de vivienda y vecindario son altas, clúster de bajo riesgo (Bajo-Bajo) donde ambas proporciones de vivienda y vecindario son

bajas y clústers atípicos (Alto-Bajo o Bajo-Alto) donde la proporción en vivienda y comunidad son diferentes.

Variables y Análisis Estadístico

El diseño de múltiples niveles del estudio consistió en observaciones repetidas de las personas (hasta 4 encuestas DAC), agrupadas en viviendas, dentro de las cuatro comunidades seleccionadas (Figura Suplementaria S1). Se utilizó un modelo lineal generalizado mixto (GLMM), con efectos fijos y una estimación de intercepto aleatorio para cada nivel con el fin de controlar los datos de muestras agrupadas. Debido a la imposibilidad en distinguir entre infecciones nuevas, relapsos o reinfecciones, se utilizó la primera parasitemia por *P. vivax* como la variable dependiente en los modelos y las observaciones posteriores fueron excluidas del análisis. Se modeló la presencia de parasitemia por *P. vivax*. (i.e prevalencia parasitaria) independientemente de los síntomas o tratamiento previo. Todas las parasitemias por *P. falciparum* fueron excluidas del análisis. Se usaron Modelos de regresión de Poisson para estimar la razón de prevalencias (RP) del resultado, asumiendo una distribución binomial para el término error y una función de enlace \log^{63-65} .

Se incluyeron co-variables dentro de cada nivel en el análisis: 7 a nivel vivienda: si el hogar está situado dentro de un clúster de alto riesgo (determinada por LISA) o a en el vecindario (distancia de 550m), estructura de la vivienda (casas con al menos una habitación cerrada o no), material de paredes, material del techo, si la vivienda recibió fumigación (IRS – por sus siglas en inglés) por la DRSL, si hay suministro de luz y si tienen animales dentro de la casa; 4 a nivel individual: género, edad (categorizado como <15 años, entre 15 y 39.9 años y ≥ 40 años para análisis de regresión), educación (ninguna o primaria y secundaria o superior para propósitos descriptivos y ninguna, primaria, secundaria y superior para análisis de regresión), ocupación al aire libre del individuo (maderero, pescador o agricultor y otros) y 2 variables dependientes del tiempo: historia de viajes en el último mes y síntomas de fiebre en cada ronda de encuestas. (Figura Suplementaria S1).

Se utilizaron dos enfoques para evaluar si los factores asociados con parasitemias por *P. vivax* varían en un nivel micro-geográfico (factores micro-epidemiológicos). El primero consistió en la construcción de un modelo único con todas las comunidades y exploración de términos de interacción entre cada factor y la comunidad (en adelante denominada modelo de “multi-comunidad”). El segundo enfoque consistió en modelos de regresión separados para cada comunidad (en adelante denominados modelos de “comunidad-

específico”). Por lo tanto, tres niveles (tiempo, individual y hogar) fueron incluidos en la ecuación para nuestro modelo multinivel de la variable dependiente parasitemia por *P. vivax* (y_{ijk}):

$$\log[E(y_{ijk})] = \delta_{000} + (V_{00k} + U_{0jk}) + \beta_{1ijk}x_{1ijk} + \dots + \varepsilon_{ijk}, \quad y \sim \text{Poisson} \quad (2)$$

Donde el subíndice ijk refiere a la observación i^{th} del individuo j^{th} de la vivienda k^{th} ; δ_{000} representa el efecto fijo del intercepto y $(V_{00k} + U_{0jk})$ representa los efectos aleatorios del intercepto de los hogares y los individuos dentro de hogares, respectivamente; β_{1ijk} representa los efectos fijos de la pendiente para los términos co-variables, y ε_{ijk} se refiere el término de error aleatorio.

Todos los modelos de regresión se realizaron en STATA 14 (StataCorp. 2015. Stata Statistical Software: Release 14. College Station, TX). La significancia estadística se definió como $p < 0.05$ y los intervalos al 95% de confianza (IC 95%) se estimaron según corresponde. Como en otros estudios epidemiológicos que aplicaron modelos multinivel^{66–69}, los análisis bivariados y multivariados se realizaron usando la misma estructura multinivel. En el análisis bivariado multinivel, la relación entre cada factor en todos los niveles (tiempo, individual y hogar) y la parasitemia por *P. vivax* en cada encuesta DAC fue analizada para el modelo multi-comunidad y los modelos de comunidad-específico.

La construcción de los modelos multivariados multinivel fue realizada utilizando un proceso forward stepwise y se utilizó el likelihood-ratio test (LRT) para comparar los modelos anidados. El modelo multi-comunidad fue construido agregando factores ordenados de acuerdo a su log-likelihood en el modelo bivariado y conservados si tenían un valor- $p < 0.2$ en el modelo ajustado. Sistemáticamente, fueron evaluados los términos de interacción entre cada factor en el modelo final y la comunidad, y las interacciones significativas (valor- $p < 0.05$) fueron conservadas. La construcción de modelos comunidad-específico consistió en un proceso independiente para cada comunidad. Factores con un valor- $p < 0.2$ en el modelo bivariado para la comunidad correspondiente fue introducido y conservado si tenían un valor- $p < 0.2$ en el modelo ajustado. Una corrección para pruebas múltiples y dependientes fue hecho usando la tasa de falso descubrimiento adaptativo (AFDR-por sus siglas en inglés)⁷⁰, usando el paquete ‘MuToss’⁷¹ en el software R v3.2 (R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Austria).

Consideraciones Éticas

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia en Lima (SIDISI: 65060). El estudio primario fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia en Lima (SIDISI: 64371) y la Dirección Regional de Salud de Loreto. Los objetivos y procedimientos del estudio fueron explicados a cada uno de los participantes, los pacientes que estuvieron de acuerdo fueron incluidos previa firma del consentimiento informado. Los padres o tutores firmaron el consentimiento de padres para la inclusión de los niños menores de 7 años. Los niños y jóvenes de 7 a 17 años firmaron un asentimiento informado y contaron con la firma del consentimiento de padres. Todos los métodos fueron llevados a cabo en concordancia con las guías nacionales aprobadas.

Este estudio ha sido autofinanciado como parte de la propuesta de tesis para optar por el grado de Magister en Ciencias en Investigación Epidemiológica de la Facultad de Salud Pública y Administración de la UPCH. El estudio primario, ha sido financiado por CIUF-CUD - *Commission universitaire pour le Développement* y por El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC).

RESULTADOS

Características socio-demográficas y de viviendas

De los 935 individuos censados en las cuatro comunidades, un total de 820 individuos (Ind) de 154 hogares (HH) fueron incluidos en el análisis, tres individuos fueron excluidos debido a la falta de datos de qPCR durante el seguimiento. Del total, 52.4% de los participantes eran hombres y 48.8% eran menores de 15 años (Tabla 1). La mayoría de individuos estudiaron primaria (completa o incompleta) representando entre el 43.2% y 61.6% de los participantes en todas las comunidades. En general, la ocupación más común era la agricultura (37.5%) y 11.7% de los individuos reportaron un viaje fuera de la comunidad en un periodo de un mes (Tabla 1). Los destinos auto-reportados más frecuentes de los 261 registros de viajes de estos participantes están presentados en la Tabla Suplementaria S1.

La muestra se distribuyó en 4 comunidades: dos comunidades grandes, LI (56 HH, 298 Ind) y UM (59 HH y 331 Ind); y dos comunidades pequeñas, GC (19 HH, 92 Ind) y PE (20 HH, 99 Ind). De todas las comunidades, 60 viviendas (39.5%) tenían casas de estructura abierta (sin puertas como para completar al menos un cuarto cerrado) con mayores proporciones en GC

y PE, que en LI y UM. Los materiales predominantes de las paredes eran cemento o madera (78.6% de HH) y palma, hoja o paja en los techos (77.6% HH). Aproximadamente un cuarto de las viviendas en cada comunidad tenían suministro de energía eléctrica, excepto UM con tres cuartas partes (76.3%) de HH con paneles solares o generadores eléctricos. Los habitantes de la mayoría de las viviendas (90.7%) reportaron que la vivienda ha recibido fumigación (IRS) por la DRSL en los últimos cinco años y un tercio (34.2%) de las viviendas tenía animales dentro de las casas.

Prevalencia parasitaria de malaria

A lo largo de las cuatro encuestas DAC 515 habitantes tenían muestras en cuatro visitas, 172 en tres visitas, 76 en dos visitas y 57 en una visita. En total, 2785 muestras de sangre fueron examinadas para la identificación de parasitemias por *Plasmodium spp* por qPCR y 2768 láminas (99.4% de las muestras recolectadas) fueron examinadas por microscopio óptico. El número acumulativo de individuos con parasitemia por *P. vivax* en el periodo de estudio y prevalencia parasitaria de *P. vivax* detectados por microscopía y qPCR se presentan en la Fig. 2.

Del total muestras de sangre analizadas, 711 (25.5%) fueron positivas para *Plasmodium spp*; 589 para *P. vivax* y 122 para *P. falciparum*. En contraste, 95 (3.4%) de las láminas disponibles fueron positivas para *Plasmodium spp.*; 89 para *P. vivax* y 6 para *P. falciparum* (Tabla 2). Cuatro muestras de sangre positivas para *P. vivax* por qPCR no estuvieron disponibles para microscopía óptica. De las 707 muestras positivas por qPCR restantes, 616 (87.1%) fueron negativas por microscopía óptica, (i.e parasitemias sub-microscópicas) con pequeñas variaciones entre encuestas (Fig. 2b). Se observó que la proporción de parasitemias sub-microscópicas es más alta en *P. falciparum* (95.1%; 116/122) que en *P. vivax* (85.5%; 500/585). La sensibilidad y especificidad de microscopía óptica usando qPCR como el método de referencia fue 12.9% (IC 95%: 10.5% – 15.6%) y 99.8% (IC 95%: 99.5% – 99.9%) respectivamente. Cuatro muestras resultaron positivas a *Plasmodium spp.* (3 *P. vivax* y 1 *P. falciparum*) en la microscopía óptica pero dieron resultados negativos en qPCR.

De los 820 participantes que fueron evaluados por qPCR al menos en una encuesta DAC, 386 (47.1%) tuvieron al menos una parasitemia por *P. vivax* y 85 (10.4%) por *P. falciparum* durante el periodo de estudio. En las encuestas, el análisis qPCR no identificó parasitemias de especies mixtas (probablemente porque los sujetos en las pruebas de vigilancia activa fueron predominantemente asintomáticos – menos del 13% fue sintomático; Tabla 1), por lo

tanto contaban con muy poca densidad parasitaria. Encontramos que 20 sujetos (2.4% del total de participantes) tuvieron *P. vivax* o *P. falciparum* en diferentes momentos. La prevalencia parasitaria de *Plasmodium spp.* por qPCR a lo largo de las cuatro encuestas varía entre 23.9% y 27.1% con una tasa de participación >80% en todas las rondas de encuestas. El total acumulativo de prevalencia parasitaria, es decir la proporción de individuos con al menos una parasitemia por *Plasmodium spp.* por qPCR en todas las comunidades y rondas de encuestas, fue 55% (451/820). Mientras que, por microscopía óptica, solo 86 (10.5%) participantes tuvieron malaria *P. vivax* y 6 (0.7%) tuvieron *P. falciparum* (Tabla 2).

Agrupaciones espaciales de parasitemias por *P. vivax* en viviendas

Casi todas las viviendas (90.3%) tuvieron al menos un participante con parasitemia por *Plasmodium spp.* durante el estudio, y 85.7% y 39.0% tuvieron ≥ 1 participantes con al menos una parasitemia por *P. vivax* o *P. falciparum* durante el seguimiento, respectivamente. Dado el pequeño número de parasitemias por *P. falciparum* qPCR positivas, los análisis de factores espaciales y de riesgo se llevaron a cabo solo para parasitemias por *P. vivax* y las parasitemias por *P. falciparum* fueron consideradas negativas para *P. vivax*. La distribución espacial a nivel hogar de los individuos con al menos una parasitemia por *P. vivax* durante el periodo de estudio se presenta en la Fig. 3.

El análisis de LISA corregido por FDR detectó agrupaciones estadísticamente significativas en tres de las cuatro comunidades (Fig. 3). Grupos de alto riesgo (y sus vecindarios) fueron considerablemente más grandes en GC y UM que en PE. En GC, el clúster de alto riesgo comprendió 5 viviendas (26.3% de las viviendas) abarcando un cuarto de la población de la comunidad (Moran's I – MI rango = 0.03 – 0.56; rango valor-p = 0.001 – 0.05) y en UM incluyó 4 viviendas (6.8% de las viviendas) abarcando 9.1% de la población de la comunidad (MI rango = 0.02 – 0.06; rango valor-p = 0.01 – 0.05). En contraste, solo 2 viviendas (10% de las viviendas) y 13.1% de los habitantes componen grupos de alto riesgo en PE (MI rango = 0.56 – 1.35; rango valor-p = 0.01 – 0.05). Adicionalmente, 4 valores atípicos (outliers) bajo-alto (lo que significa que viviendas con baja parasitemia estaban rodeadas por un vecindario con alta parasitemia) fueron detectados en GC y 2 en UM, mientras que solo 1 outlier alto-bajo (lo que significa que viviendas con alta parasitemia fueron rodeadas por un vecindario con baja parasitemia) fue detectado en GC.

Análisis multinivel de la prevalencia parasitaria por *P. vivax*

El likelihood-ratio test entre las regresiones de Poisson con efectos mixtos y solo efectos fijos fue estadísticamente significativa, mostrando que la estructura jerárquica de los datos estaba mejor ajustada por una regresión de efectos mixtos. Las estimaciones de los coeficientes de efectos aleatorios para modelos nulos, multivariados multi-comunidad y modelos comunidad-específicos se presentan en las Tablas Suplementarias S2 y S3, mostrando un agrupamiento moderado de parasitemias por *P. vivax* a nivel individuo y hogar. Para evaluar si la censura de datos positivos a *P. vivax* sesgan los estimados de los modelos de regresión se compararon con los estimados de un modelo colapsado a nivel individual (Tabla Suplementaria S4), encontrándose en todos los casos variaciones inferiores al 10%, demostrando que el modelo descrito en la sección 'Variables y Análisis Estadístico' ajusta las razones de prevalencias por el número de observaciones de cada individuo que ingresa al modelo. Estos son los resultados mostrados a continuación.

La presencia de fiebre en el momento de la visita y estudios de primaria fueron significativos en el análisis bivariado del modelo multi-comunidad (Tabla 3). Adicionalmente, la prevalencia parasitaria de *P. vivax* fue más alta en LI (razón de prevalencia – RP = 1.72; IC 95%: 1.14 – 2.58; valor-p=0.01) y UM (RP=1.54; IC 95%: 1.03 – 2.31; valor-p=0.04) que en GC. Otras variables epidemiológicas asociadas de forma independiente (con un valor-p <0.1) con una alta prevalencia parasitaria de *P. vivax* fueron observadas con los modelos comunidad-específico: educación en GC (primaria) y PE (secundaria y estudios superiores); presencia de fiebre al momento de la visita y animales en la vivienda en UM, registro de viaje, ocupación y ubicación en un clúster de alto riesgo en PE, y material de la pared y edad entre 15 y 39 en GC (Tabla 3).

Las estimaciones del modelo multivariado multi-comunidad se presentan en la tabla 4. La presencia de fiebre al momento de la visita (razón de prevalencia ajustado – RPA=1.73; IC 95%: 1.11 – 2.71; valor-p=0.01), educación primaria (RPA=1.27; IC 95%: 1.01 – 1.60; valor-p=0.04) y vivir en una vivienda localizada en un clúster de alto riesgo (RPA=1.47; IC 95%: 1.09 – 1.98; valor-p=0.01) permanecieron asociadas con una alta prevalencia parasitaria de *P. vivax*, mientras que edad >40 años (RPA=0.69; IC 95%: 0.49 – 0.98; valor-p=0.04) permaneció asociada con una baja prevalencia parasitaria de *P. vivax*, incluso luego de ser ajustados por comunidad. Además, los términos de interacción significativos demuestran que los efectos de viajar y de ocupación en la prevalencia parasitaria de *P. vivax* varían según comunidad. La prevalencia parasitaria de *P. vivax* fue más alta en madereros,

pescadores y agricultores de UM (RPA=1.52; IC 95%: 1.02 – 2.27; valor-p=0.04) y GC (RPA=2.07; IC 95%: 1.00 – 4.28; valor-p=0.05) que aquellos en LI. Mientras que un viaje en un periodo de un mes estaba asociado con una alta prevalencia parasitaria de *P. vivax* solo en PE (RPA=2.93; IC 95%: 1.13 – 7.64; valor-p=0.03) (Tabla 4). Otros términos de interacción fueron examinados (i.e fiebre y edad) pero ninguno fue significativo.

Los modelos multivariados comunidad-específicos (Tabla 5) muestran diferencias notables de los factores de riesgo para *P. vivax* entre las comunidades. Tres factores se asociaron con una alta prevalencia parasitaria de *P. vivax* en GC: madereros, pescadores y agricultores (RPA=2.21; IC 95%: 1.01 – 4.84; valor-p=0.04) que viven en viviendas con paredes de palma, hojas y pajas o plástico corrugado (RPA=3.11; IC 95%: 1.27 – 7.61; valor-p=0.01) que no han recibido fumigación IRS (RPA=2.58; IC 95%: 1.04 – 6.42, valor-p=0.04); luego de ajustar por de si la vivienda está ubicada en un clúster de alto riesgo. En LI, ninguna variable significativa se mantuvo en el modelo multivariado, mostrando un efecto predominante de edad mayor a 40 años (RPA=0.71, IC 95%: 0.50 – 1.02; valor-p=0.06) asociado (con $p < 0.1$) con una baja prevalencia parasitaria de *P. vivax* luego de ajustar por estructura de la vivienda.

En PE, los habitantes que reportaron un viaje en el último mes (RPA=3.11, IC 95%: 1.25 – 7.74; valor-p=0.01) y vivir en un clúster de alto riesgo (RPA=2.96, IC 95%: 1.26 – 6.90; valor-p=0.01) están asociados con una alta prevalencia parasitaria de *P. vivax* luego de ajustar por ocupación y género. Finalmente, en UM, la presencia de fiebre al momento de la visita fue la variable más importante (RPA=2.64; IC 95%: 1.31 – 5.31; valor-p=0.002) asociada con una alta prevalencia parasitaria de *P. vivax* luego de ajustar por ocupación (RPA=1.36; IC 95%: 1.01 – 1.82; valor-p=0.04) y si la vivienda está ubicada en un clúster de alto riesgo (RP=1.24; IC 95%: 0.96 – 1.58; valor-p=0.08).

DISCUSIÓN

En este estudio hemos determinado la agregación espacial de las parasitemias por *P. vivax* dentro y entre comunidades rurales de la Amazonia Peruana, así como determinado la heterogeneidad en los factores de riesgo a nivel micro-geográfico. En la Amazonía peruana, como en otras regiones endémicas de malaria, estas variaciones micro-geográficas en los factores de riesgo de malaria son consistentemente sub-valorados por los formuladores de políticas de salud pública como importantes para las estrategias de control de la malaria. Usando herramientas moleculares y detección activa de casos, este estudio demostró que

las parasitemias por *P. vivax* son altamente heterogéneas dentro y entre comunidades rurales de la Amazonía Peruana, donde una gran proporción de habitantes tienen parasitemias sub-microscópicas por *P. falciparum* y *P. vivax*^{14,33,72-75}. Este estudio encontró además, que comunidades a una escala espacial de pequeña a moderada (1km a 15km) difieren en la prevalencia de malaria, y que tales diferencias estaban influenciadas por factores tales como edad, nivel educativo y ubicación de las viviendas en clústers de alto riesgo, así como también factores que se ajustan a un contexto micro-geográfico local como viajes y ocupación. Observamos que los patrones de agrupación espacial de parasitemias por *P. vivax* difieren entre comunidades con diferentes perfiles de movilización relacionadas al trabajo. Los patrones complejos de transmisión observados en esta área parecen ser determinados por la movilización humana entre comunidades en la misma micro-cuenca. Este concepto, clave y descuidado, debe ser entendido para convertirse en un punto crítico de intervención para el control de la malaria en la Amazonía Peruana.

La magnitud de las parasitemias asintomáticas en esta región desafía la clasificación tradicional de esta Región como hipo-endémica. Nuestros resultados muestran que todas las comunidades tuvieron una prevalencia de *P. vivax* mayor al 25% al cabo de cuatro encuestas transversales. Estudios previos indican que solo algunas infecciones precedentes – ya sea por *P. vivax* o *P. falciparum* en la Amazonía- pueden conducir a una inmunidad clínica en esta Región que se manifiesta con parasitemias asintomáticas^{13,33,73,76,77}. Nuestros datos sugieren que la relativamente alta prevalencia de parasitemias por malaria en las poblaciones de estudio conduce a que se mantenga la transmisión a una escala micro-geográfica. Un problema inevitable con el presente análisis es que no podemos diferenciar de forma cuantitativa la contribución de infecciones agudas nuevas de relapsos de hipnozoitos provenientes de una infección previa a la transmisión actual. Sin embargo, estudios previos indican que, en la Amazonía peruana, la mayoría de relapsos son asintomáticos y por ende capaces de transmitirse a los mosquitos.^{44,78} Además, en regiones tropicales como la Amazonía Peruana, los relapsos tienden a ocurrir de forma rápida a una frecuencia de tres a diez semanas⁷⁸⁻⁸². Nuestra data es concordante con la noción que la parasitemia por *P. vivax* asintomática -ya sea de infección nueva o distante- conduce a que se mantenga una transmisión de malaria en una escala mayor a la que se conocía previamente^{13,14,33}. Una limitación de este análisis es la demostración real y cuantificación de la transmisibilidad de las parasitemias asintomáticas de bajo nivel a mosquitos, dicho trabajo está en progreso en nuestro centro/laboratorio de estudio en Loreto.

La extensa data del seguimiento espacio-temporal permite una evaluación detallada de parasitemias por *P. vivax* en estas comunidades. Esto permitió estimar adecuadamente el potencial de transmisión de parasitemias de malaria patentes/sub-patentes y sintomática/asintomática, aún si fue una infección aguda nueva o un relapso de hipnozoitos. Si la exposición e infección son realmente más altas sobre pequeñas áreas geográficas, la mayoría de habitantes albergarán bajas parasitemias -probablemente debido a la inmunidad adquirida del huésped- con importantes implicancias para las estrategias de control de malaria ^{25-29,69,83}, más aún si los habitantes frecuentemente tienen contacto con ambientes de alta transmisión como se observó en otros estudios ^{14,20,33}. Nuestro análisis espacial de agrupamiento dentro de la comunidad muestra que en comunidades como GC y UM, donde se encontró que habían grandes clústers de parasitemias por *P. vivax*, fueron identificadas como comunidades cerradas y aisladas. De hecho, los datos mostraron que casi todos los hogares tenían al menos un individuo infectado asintomático, sugiriendo que a gran escala (i.e micro-cuenca), estas comunidades son focos de parásitos. No obstante, agrupamiento espacial a nivel comunidad puede ser una consecuencia de la distribución espacial de viviendas y criaderos de mosquitos. Como ha demostrado previamente, *An. darlingi* se ha adaptado a diversos tipos de hábitats ^{84,85}, con actividad focal relacionada a una alta densidad cerca de los criaderos ^{61,62}. En comunidades ribereñas tropicales, estas condiciones favorables se forman por inundaciones estacionales y fuertes lluvias intermitentes ^{52,86}, permitiendo múltiples criaderos de mosquitos principalmente en el gran número de pequeñas quebradas de bajo flujo próximos a las viviendas ⁸⁷⁻⁸⁹. En contraste, comunidades con alta movilización poblacional relacionadas al trabajo, como PE y LI tuvieron poco o no ningún agrupamiento de parasitemias, respectivamente.

En UM, los agrupamientos con alto riesgo fueron observados en un área altamente deforestada con una importante cobertura vegetal. Estudios han demostrado que estas áreas deforestadas son criaderos preferibles para *An. darlingi* en la Amazonía rural ⁹⁰⁻⁹². UM es una comunidad geográficamente aislada sobre el río Napo y es el asentamiento del grupo étnico Yagua ⁹³. Las costumbres tradicionales pueden jugar un papel importante en las interacciones de la comunidad, así, se encontró que la movilización de esta población era menos común que en comunidades en la micro-cuenca del Río Mazán. El movimiento poblacional en esta comunidad, principalmente hacia la comunidad de Mazán y la ciudad de Iquitos, se da principalmente por actividades laborales relacionadas a actividades de turismo ecológico hechas por visitantes como en otras comunidades de la micro-cuenca del Río Napo. Se observó un patrón de agrupamiento similar en una de las comunidades más

alejada de la micro-cuenca del río Mazán, GC. En esta comunidad, el clúster de alto riesgo se localizó cerca a 'cocha' (laguna), donde el ecosistema de agua estancada probablemente contribuye a criaderos de *An. darlingi*. Consistentemente, en GC, una alta movilización poblacional se observó hacia Maucallacta, una comunidad cercana con bajo riesgo de malaria durante el periodo de estudio según los registros de la DRSL.

Las comunidades restantes sobre la micro-cuenca del río Mazán muestran una agrupación espacial y patrones de movilización diferentes. LI y PE son comunidades contiguas con la mayor transmisión de malaria en la micro-cuenca del río Mazán. Sin embargo, ambos son las comunidades más grandes y desarrolladas en esta micro-cuenca. Estas comunidades se dedican principalmente a actividades extractivas y en consecuencia la movilidad relacionada al trabajo es mayor que en GC o UM. De forma interesante, las localidades relacionadas con las actividades extractivas reportadas por Parker *et al.*⁴⁸ como áreas de transmisión de malaria híper-endémicas, fueron los destinos más importantes de aquellos que viajaron por trabajo entre los habitantes de LI y PE. Esta frecuente afluencia de individuos infectados sugiere una alta vulnerabilidad (i.e, tasa de importación de malaria) en estas comunidades^{94,95}, como en otras regiones amazónicas⁹⁶.

Nuestros hallazgos muestran que *P. vivax* predomina sobre *P. falciparum*, consistente con los datos de vigilancia de la DRSL. La prevalencia en estas comunidades varía entre 29% y 51% para *P. vivax* y entre 7% y 14% para *P. falciparum*. Además, comunidades en diferentes micro-cuencas muestran una alta heterogeneidad en la prevalencia parasitaria de *P. vivax*, diferencias significativas se observaron también entre comunidades vecinas como LI y PE. Nuestros hallazgos en comunidades rurales de la región Amazónica son consistentes con estudios recientes que muestran una alta heterogeneidad entre comunidades a una escala micro-geográfica a lo largo de la frontera entre China y Myanmar, donde *P. vivax* predomina^{45,47}; en el occidente de Kenya, donde la mayoría de infecciones por *P. falciparum* son sub-microscópicas y asintomáticas⁴⁶; y en comunidades periurbanas en la región Loreto del Perú¹⁴. Además de la movilización de la población humana, las poblaciones y el comportamiento de los vectores podrían ser otro factor contribuyente a las heterogeneidades micro-geográficas en la transmisión de malaria. Moreno *et al.*¹⁰ reportó una alta heterogeneidad espacio-temporal en la tasa de inoculación entomológica (EIR - por sus siglas en inglés) entre las comunidades rurales y semi-urbanas en la región amazónica y Lainhart *et al.*⁹ reportó dos subpoblaciones principales de *An. darlingi* entre las comunidades alrededor de Iquitos, incluyendo muestras de Mazán recolectadas en LI. Presuntamente, estas

poblaciones genéticamente diferenciadas están asociadas con comportamientos de mordedura de *An. darlingi* diferentes⁹⁷.

El análisis multinivel provee importantes perspectivas sobre la transmisión de malaria en estas micro-cuencas. Entre todas las comunidades (i.e modelo multi-comunidad), nuestros hallazgos muestran que los habitantes más jóvenes tienen una prevalencia parasitaria de *P. vivax* más alta. Este efecto de parasitemia dependiente de la edad es consistente en general con estudios llevados a cabo en Kenia^{46,98}, Papua Nueva Guinea⁹⁹, Botswana¹⁰⁰, Etiopía^{101,102}, y Brasil⁷², donde la prevalencia parasitaria y la densidad decrece con el edad. Consistentemente, la presencia de fiebre al momento de la visita se mantiene como un síntoma específico para la prevalencia parasitaria de *P. vivax* particularmente en niños, indicando una relación inversa entre la edad y la falta de inmunidad adquirida. En la región amazónica del Perú, el control de la densidad parasitaria de los individuos puede ser fomentado por la alta clonalidad de las poblaciones de parásitos observados en un nivel local en la región amazónica del Perú^{8,32,34,103}, y la alta EIR, como se describe en comunidades similares del alto río en la micro-cuenca del río Mazán⁴⁸.

Particularmente importante es que la prevalencia parasitaria de *P. vivax* en LI fue más alta que en otras comunidades de la misma micro-cuenca o de la micro-cuenca del río Napo (rangos entre 1.75 a 3.4 veces) tomando en cuenta la heterogeneidad dentro de las comunidades, y así, confirmando la alta heterogeneidad entre comunidades. Además, se observó una importante heterogeneidad en factores de riesgo para la prevalencia parasitaria de *P. vivax* entre comunidades. El significado de los términos de la interacción de la comunidad con viajes y ocupación indica que las comunidades no se comportan como una sola población. En lugar de esto, madereros, pescadores y agricultores de UM y GC tuvieron una mayor prevalencia parasitaria de *P. vivax* que aquellos de LI. Complementariamente, el registro de viajes se asoció a una alta prevalencia parasitaria de *P. vivax* en PE. Estos factores de riesgo para transmisión de malaria fueron reportados previamente en la región amazónica^{14,69,104}. Sin embargo, este estudio demuestra el efecto específico por comunidad estas variables.

Describimos aquí una asociación espacial no estacionaria entre parasitemia por *P. vivax* y factores de riesgo en las comunidades bajo estudio. Este efecto fue observado en diversos escenarios donde un factor estimado de riesgo global puede ser inapropiado dado que promedian relaciones que no son transferibles a todos los contextos locales^{105–108}. En el

enfoque específico por comunidad, los habitantes que viajan fuera de su comunidad tuvieron una prevalencia parasitaria de *P. vivax* tres veces mayor en PE. Además, madereros, pescadores y agricultores tenían una prevalencia parasitaria de *P. Vivax* más alta en GC (2.2 veces) y UM(1.4 veces). De manera interesante, la presencia de fiebre al momento de la visita estuvo asociada con una prevalencia parasitaria de *P. vivax* más alta solo en UM. Esta manifestación clínica se observa generalmente en poblaciones susceptibles que no habían estado previamente expuestos a las poblaciones actuales de parásitos ^{109,110}, sugiriendo una alta receptividad (i.e, el potencial de transmisión local) en esta comunidad. Un factor adicional fue asociado con la prevalencia parasitaria de *P. vivax* en GC usando este enfoque. Los habitantes que reportaron que sus viviendas no recibieron fumigación IRS por el Ministerio de Salud tuvieron una prevalencia parasitaria de *P. vivax* más alta. En el 2014, la DRSL empezó una campaña de IRS en varias comunidades sobre los ríos Napo y Mazán, incluyendo todas las comunidades de nuestra área de estudio. Este efecto protector de IRS también ha sido reportado en estudios previos ^{51,111} y recomendado como un importante componente dentro de los programas de control y eliminación ^{112,113}. Sin embargo, este efecto no fue significativo en otras comunidades, apoyando la hipótesis que los individuos que se movilizan adquieren la infección fuera de las comunidades en las que residen.

El intenso flujo de personas infectadas y no infectadas entre las comunidades de estas micro-cuencas, ha establecido posiblemente una red de transmisión enmarañada, generando patrones de transmisión comunitarios complejos ^{114,115} y asociados con el incremento de la heterogeneidad de transmisión ^{18,116,117} y facilitando la mezcla entre poblaciones de parásitos ³⁰⁻³². Delgado-Ratto *et al.* ³⁴ muestra la importancia del movimiento poblacional en el movimiento geográfico de las poblaciones genéticas de parásitos y, por lo tanto, el desarrollo de sub-estructuración de poblaciones de parásitos observados en las comunidades alrededor de Iquitos. El análisis de genotipificación de aislados reportado por Van den Eede *et al.* ³² con muestras de la comunidad de Mazán, mostró una alta heterogeneidad y fuerte diferenciación de otros aislados alrededor de Iquitos, sugiriendo diversas fuentes geográficas de sub-poblaciones de parásitos. La activación de hipnozoitos heterólogos adquiridos durante toda la vida en adultos ^{39,118} no puede ser excluido como una explicación de la sub-estructuración de la población de parásitos observada en estas comunidades. Sin embargo, los relapsos en estas áreas probablemente surgieron de infecciones en el pasado cercano (3-10 semanas) ⁷⁹⁻⁸², sugiriendo que el origen de la mezcla de poblaciones de parásitos es principalmente la movilización de la población humana entre

comunidades con transmisión focalizada. Como este contexto ribereño es común en la Amazonía, es probable que el rebote de malaria observado en el 2011 fue acelerado debido a la alta vulnerabilidad y receptividad de las comunidades ribereñas^{15,95,119,120}. En tal sentido, se necesita trabajo adicional para determinar las áreas 'fuente' y 'sumidero' para infecciones de malaria en la red fluvial Amazónica¹²¹⁻¹²³ y desarrollar un marco integral de movilización de población humana en comunidades Amazónicas^{124,125} para prevenir la importación de malaria durante el transporte (de áreas hipo-endémicas a hiper-endémicas) o de regreso¹¹⁶.

Este estudio tiene algunas limitaciones. A pesar de los esfuerzos en cada encuesta para cubrir a la mayoría de miembros de la comunidad, se encontró una tasa de participación de al menos 80% en cada una de la encuesta. Cuando pudimos contactar a una persona, no observados ningún rechazo para participar del estudio. En su lugar, la razón más importante para datos faltantes o incompletos fue el hecho que los individuos estuvieron fuera del área por diferentes razones, como trabajo, reclutamiento del ejército nacional y las festividades. Es por lo tanto, apropiado asumir que los datos faltantes fueron aleatorios (MAR – por sus siglas en inglés). De hecho, los modelos multinivel usados no se afectan por datos faltantes de manera aleatoria^{126,127}. Otro problema que puede haber afectado nuestras estimaciones es el límite de detección de nuestro método de diagnóstico molecular que usa papeles filtro. Según lo reportado previamente en entornos Amazónicos⁶⁹, los individuos infectados pueden contener densidades parasitarias muy bajas, y a esas densidades la probabilidad de detectar una molécula de ADN de malaria es aleatoria. Es decir, el PCR basado en papel filtro solo puede subestimar el efecto potencial de las parasitemias asintomáticas en la movilización y transmisión de infecciones, y como fue discutido anteriormente, el potencial de transmisión de parasitemias bajas tiene que ser determinado.

Sin embargo, y debido a que en este trabajo presentamos una prevalencia de *P. vivax* elevada en comparación a otros artículos en la Amazonía Peruana, es importante discutir dos factores que influyen en este resultado. El primero es que por diseño del estudio, se seleccionaron comunidades con la mayor transmisión de malaria en el distrito de Mazán. Es importante mencionar que otros estudios han seleccionado las comunidades en base a la alta transmisión reportada por la DRSL^{13,14} y a pesar de esto no han reportado una prevalencia tan alta como la presentada en este estudio. El segundo factor que puede influenciar este resultado es el uso de medidas repetidas. Si bien, la probabilidad de detectar al parásito al cabo de 4 diagnósticos es más alta que un estudio transversal simple debido al curso natural de la enfermedad, los cortes transversales de este estudio estuvieron

separados 10 días, es decir, la cantidad de personas con parasitemias de *P. vivax* encontrada corresponde a la carga detectada en un mes de estudio.

CONCLUSIONES

Este estudio resalta la alta prevalencia de *P. vivax* en comunidades rurales de la Amazonía Peruana. Esta prevalencia se encuentra distribuida de forma heterogénea dentro de las comunidades, encontrándose clústers de altas parasitemias de *P. vivax*, y entre comunidades de la misma microcuenca. Los análisis realizados en este estudio sugieren que estas heterogeneidades en las prevalencias de *P. vivax* se deben a factores comunes entre comunidades, como edad, educación, fiebre y vivir en un clúster de alta parasitemia; así como factores que se ajustan a realidades particulares de cada comunidad, como la ocupación y movilización. En consecuencia, esta micro-epidemiología debe ser tomada en cuenta para adaptar estrategias para el control efectivo de malaria y su futura eliminación en comunidades rurales de la región Amazónica. La evidencia de este y de otros estudios sobre el gran reservorio de infecciones sub-microscópicas, alta heterogeneidad en factores de riesgo para *P. vivax* y la agrupación espacial de la transmisión, requiere el compromiso de las autoridades de salud pública para reformular las estrategias de control de malaria basadas en la detección sensible de parásitos y vigilancia activa de parasitemias.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO Global Malaria Programme. *World Malaria Report 2014*. (WHO, Geneva, 2014).
2. Bhatt, S. *et al.* The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature* **526**, 207–211 (2015).
3. Ministerio de Salud del Peru. Sala de Situación de Salud: Malaria. (2015).
4. Roper, M. H. *et al.* The epidemiology of malaria in an epidemic area of the Peruvian Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **62**, 247–256 (2000).
5. Aramburú Guarda, J., Ramal Asayag, C. & Witzig, R. Malaria reemergence in the Peruvian Amazon region. *Emerg. Infect. Dis.* **5**, 209–215 (1999).
6. Griffing, S. M., Gamboa, D. & Udhayakumar, V. The history of 20th century malaria control in Peru. *Malar. J.* **12**, 303 (2013).
7. Organismo Andino de Salud-PAMAFRO. *Compartiendo lecciones aprendidas*. (2009).
8. Rosas-Aguirre, A. *et al.* Epidemiology of *Plasmodium vivax* Malaria in Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (2016). doi:10.4269/ajtmh.16-0268
9. Lainhart, W. *et al.* Evidence for temporal population replacement and the signature of ecological adaptation in a major Neotropical malaria vector in Amazonian Peru. *Malar. J.* **14**, 375 (2015).
10. Moreno, M. *et al.* Implications for changes in *Anopheles darlingi* biting behaviour in three communities in the peri-Iquitos region of Amazonian Peru. *Malar. J.* **14**, 290 (2015).
11. Fernández, R., Vera, H. & Calderón, G. Historical review of the distribution of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *darlingi* (Diptera: Culicidae) in the Peruvian Amazon. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública* **31**, 310–318 (2014).
12. Reinbold-Wasson, D. D. *et al.* Determinants of *Anopheles* seasonal distribution patterns across a forest to periurban gradient near Iquitos, Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **86**, 459–463 (2012).
13. Roshanravan, B. *et al.* Endemic malaria in the Peruvian Amazon region of Iquitos. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **69**, 45–52 (2003).
14. Rosas-Aguirre, A. *et al.* Hotspots of Malaria Transmission in the Peruvian Amazon: Rapid Assessment through a Parasitological and Serological Survey. *PLoS One* **10**, e0137458 (2015).
15. Quispe, A. M. *et al.* Accelerating to Zero: Strategies to Eliminate Malaria in the Peruvian Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 15–0369 (2016). doi:10.4269/ajtmh.15-0369
16. Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI): Perú. Estado de la Población Peruana 2015. (2015).
17. Bousema, T. *et al.* Hitting Hotspots: Spatial Targeting of Malaria for Control and Elimination. *PLoS Med* **9**, e1001165 (2012).
18. Bousema, T. *et al.* Identification of hot spots of malaria transmission for targeted malaria control. *J. Infect. Dis.* **201**, 1764–1774 (2010).

19. Bejon, P. *et al.* Stable and Unstable Malaria Hotspots in Longitudinal Cohort Studies in Kenya. *PLoS Med* **7**, e1000304 (2010).
20. Rosas-Aguirre, A. *et al.* Plasmodium vivax malaria at households: spatial clustering and risk factors in a low endemicity urban area of the northwestern Peruvian coast. *Malar. J.* **14**, 176 (2015).
21. Rodríguez, M. H., Betanzos-Reyes, A. F. & Grupo de Trabajo de Malaria del Sistema Mesoamericano de Salud Pública. [Plan to improve malaria control towards its elimination in Mesoamerica]. *Salud Pública México* **53 Suppl 3**, S333-348 (2011).
22. Carter, R., Mendis, K. N. & Roberts, D. Spatial targeting of interventions against malaria. *Bull. World Health Organ.* **78**, 1401–1411 (2000).
23. Coleman, M. *et al.* Using the SaTScan method to detect local malaria clusters for guiding malaria control programmes. *Malar. J.* **8**, 68 (2009).
24. Mosha, J. F. *et al.* The independent effect of living in malaria hotspots on future malaria infection: an observational study from Misungwi, Tanzania. *Malar. J.* **13**, 445 (2014).
25. Bousema, T., Okell, L., Felger, I. & Drakeley, C. Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 833–840 (2014).
26. Cheng, Q., Cunningham, J. & Gatton, M. L. Systematic review of sub-microscopic P. vivax infections: prevalence and determining factors. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **9**, e3413 (2015).
27. Moreira, C. M., Abo-Shehada, M., Price, R. N. & Drakeley, C. J. A systematic review of sub-microscopic Plasmodium vivax infection. *Malar. J.* **14**, 360 (2015).
28. Okell, L. C. *et al.* Factors determining the occurrence of submicroscopic malaria infections and their relevance for control. *Nat. Commun.* **3**, 1237 (2012).
29. Lin, J. T., Saunders, D. L. & Meshnick, S. R. The role of submicroscopic parasitemia in malaria transmission: what is the evidence? *Trends Parasitol.* **30**, 183–190 (2014).
30. Delgado-Ratto, C. *et al.* Population structure and spatio-temporal transmission dynamics of Plasmodium vivax after radical cure treatment in a rural village of the Peruvian Amazon. *Malar. J.* **13**, 8 (2014).
31. Kosek, M. *et al.* High degree of Plasmodium vivax diversity in the Peruvian Amazon demonstrated by tandem repeat polymorphism analysis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **86**, 580–586 (2012).
32. Eede, P. V. den *et al.* Multilocus genotyping reveals high heterogeneity and strong local population structure of the Plasmodium vivax population in the Peruvian Amazon. *Malar. J.* **9**, 151 (2010).
33. Branch, O. *et al.* Clustered local transmission and asymptomatic Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax malaria infections in a recently emerged, hypoendemic Peruvian Amazon community. *Malar. J.* **4**, 27 (2005).
34. Delgado-Ratto, C. *et al.* Population Genetics of Plasmodium vivax in the Peruvian Amazon. *PLOS Negl Trop Dis* **10**, e0004376 (2016).
35. Mueller, I. *et al.* Key gaps in the knowledge of Plasmodium vivax, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect. Dis.* **9**, 555–566 (2009).

36. Krotoski, W. A. Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial relapse. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **79**, 1–11 (1985).
37. Grietens, K. P. *et al.* Adherence to 7-Day Primaquine Treatment for the Radical Cure of *P. vivax* in the Peruvian Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **82**, 1017–1023 (2010).
38. Lin, J. T. *et al.* Using Amplicon Deep Sequencing to Detect Genetic Signatures of *Plasmodium vivax* Relapse. *J. Infect. Dis.* **212**, 999–1008 (2015).
39. Imwong, M. *et al.* Relapses of *Plasmodium vivax* infection usually result from activation of heterologous hypnozoites. *J. Infect. Dis.* **195**, 927–933 (2007).
40. Chen, N., Auliff, A., Rieckmann, K. & Cheng, Q. Relapses of *Plasmodium vivax* Infection Result from Clonal Hypnozoites Activated at Predetermined Intervals. *J. Infect. Dis.* **195**, 934–941 (2007).
41. de Araujo, F. C. F., de Rezende, A. M., Fontes, C. J. F., Carvalho, L. H. & Alves de Brito, C. F. Multiple-clone activation of hypnozoites is the leading cause of relapse in *Plasmodium vivax* infection. *PloS One* **7**, e49871 (2012).
42. McCollum, A. M. *et al.* Genetic variation and recurrent parasitaemia in Peruvian *Plasmodium vivax* populations. *Malar. J.* **13**, 67 (2014).
43. WHO | WHO malaria terminology. WHO Available at: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/malaria-terminology/en/>. (Accessed: 25th March 2017)
44. Eede, P. V. den *et al.* *Plasmodium vivax* Sub-Patent Infections after Radical Treatment Are Common in Peruvian Patients: Results of a 1-Year Prospective Cohort Study. *PLOS ONE* **6**, e16257 (2011).
45. Xu, X. *et al.* Microgeographic Heterogeneity of Border Malaria During Elimination Phase, Yunnan Province, China, 2011-2013. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 1363–1370 (2016).
46. Idris, Z. M. *et al.* High and Heterogeneous Prevalence of Asymptomatic and Sub-microscopic Malaria Infections on Islands in Lake Victoria, Kenya. *Sci. Rep.* **6**, 36958 (2016).
47. Hu, Y. *et al.* Seasonal dynamics and microgeographical spatial heterogeneity of malaria along the China-Myanmar border. *Acta Trop.* **157**, 12–19 (2016).
48. Parker, B. S. *et al.* Hyperendemic malaria transmission in areas of occupation-related travel in the Peruvian Amazon. *Malar. J.* **12**, 178 (2013).
49. Pizzitutti, F. *et al.* A validated agent-based model to study the spatial and temporal heterogeneities of malaria incidence in the rainforest environment. *Malar. J.* **14**, 514 (2015).
50. Smith, D. L., McKenzie, F. E., Snow, R. W. & Hay, S. I. Revisiting the Basic Reproductive Number for Malaria and Its Implications for Malaria Control. *PLoS Biol* **5**, e42 (2007).
51. Loha, E., Lunde, T. M. & Lindtjorn, B. Effect of Bednets and Indoor Residual Spraying on Spatio-Temporal Clustering of Malaria in a Village in South Ethiopia: A Longitudinal Study. *PLoS ONE* **7**, e47354 (2012).
52. Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú. Available at: <http://www.senamhi.gob.pe>. (Accessed: 22nd August 2015)

53. Hartung, C. *et al.* Open data kit: tools to build information services for developing regions. in *Proceedings of the 4th ACM/IEEE International Conference on Information and Communication Technologies and Development* 18 (ACM, 2010).
54. Raja, A., Tridane, A., Gaffar, A., Lindquist, T. & Pribadi, K. Android and ODK based data collection framework to aid in epidemiological analysis. *Online J. Public Health Inform.* **5**, 228 (2014).
55. Ministerio de Salud del Perú. *Manual de Procedimientos de Laboratorio Para El Diagnóstico de Malaria.* (MINSAs).
56. Mangold, K. A. *et al.* Real-Time PCR for Detection and Identification of Plasmodium spp. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 2435–2440 (2005).
57. Benjamini, Y. & Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* **57**, 289–300 (1995).
58. Caldas de Castro, M. & Singer, B. H. Controlling the False Discovery Rate: A New Application to Account for Multiple and Dependent Tests in Local Statistics of Spatial Association. *Geogr. Anal.* **38**, 180–208 (2006).
59. Anselin, L., Syabri, I. & Kho, Y. GeoDa: An Introduction to Spatial Data Analysis. *Geogr. Anal.* **38**, 5–22 (2006).
60. Charlwood, J. D. & Alecrim, W. A. Capture-recapture studies with the South American malaria vector *Anopheles darlingi*, Root. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **83**, 569–576 (1989).
61. Barros, F. S. M. de & Honório, N. A. Man biting rate seasonal variation of malaria vectors in Roraima, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **102**, 299–302 (2007).
62. Achee, N. L., Grieco, J. P., Andre, R. G., Rejmankova, E. & Roberts, D. R. A mark-release-recapture study using a novel portable hut design to define the flight behavior of *Anopheles darlingi* in Belize, Central America. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **21**, 366–379 (2005).
63. Wacholder, S. Binomial regression in GLIM: estimating risk ratios and risk differences. *Am. J. Epidemiol.* **123**, 174–184 (1986).
64. McNutt, L.-A., Wu, C., Xue, X. & Hafner, J. P. Estimating the Relative Risk in Cohort Studies and Clinical Trials of Common Outcomes. *Am. J. Epidemiol.* **157**, 940–943 (2003).
65. Zou, G. A Modified Poisson Regression Approach to Prospective Studies with Binary Data. *Am. J. Epidemiol.* **159**, 702–706 (2004).
66. Mauny, F., Viel, J. F., Handschumacher, P. & Sellin, B. Multilevel modelling and malaria: a new method for an old disease. *Int. J. Epidemiol.* **33**, 1337–1344 (2004).
67. Peterson, I., Borrell, L. N., El-Sadr, W. & Teklehaimanot, A. Individual and household level factors associated with malaria incidence in a highland region of Ethiopia: a multilevel analysis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **80**, 103–111 (2009).
68. Woyessa, A., Deressa, W., Ali, A. & Lindtjorn, B. Malaria risk factors in Butajira area, south-central Ethiopia: a multilevel analysis. *Malar. J.* **12**, 273 (2013).
69. Barbosa, S. *et al.* Epidemiology of Disappearing Plasmodium vivax Malaria: A Case Study in Rural Amazonia. *PLoS Negl Trop Dis* **8**, e3109 (2014).
70. Benjamini, Y. & Hochberg, Y. On the Adaptive Control of the False Discovery Rate in Multiple Testing With Independent Statistics. *J. Educ. Behav. Stat.* **25**, 60–83 (2000).

71. MuToss Coding Team *et al.* mutoss: Unified Multiple Testing Procedures. (2015).
72. Ladeia-Andrade, S., Ferreira, M. U., Carvalho, M. E. de, Curado, I. & Coura, J. R. Age-Dependent Acquisition of Protective Immunity to Malaria in Riverine Populations of the Amazon Basin of Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **80**, 452–459 (2009).
73. Alves, F. P. *et al.* High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **66**, 641–648 (2002).
74. da Silva, N. S. *et al.* Epidemiology and control of frontier malaria in Brazil: lessons from community-based studies in rural Amazonia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **104**, 343–350 (2010).
75. Katsuragawa, T. H. *et al.* The Dynamics of Transmission and Spatial Distribution of Malaria in Riverside Areas of Porto Velho, Rondônia, in the Amazon Region of Brazil. *PLOS ONE* **5**, e9245 (2010).
76. Chuquiyaui, R. *et al.* Genome-Scale Protein Microarray Comparison of Human Antibody Responses in *Plasmodium vivax* Relapse and Reinfection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (2015). doi:10.4269/ajtmh.15-0232
77. Torres, K. J. *et al.* Genome-level determination of *Plasmodium falciparum* blood-stage targets of malarial clinical immunity in the Peruvian Amazon. *J. Infect. Dis.* **211**, 1342–1351 (2015).
78. Durand, S. *et al.* Efficacy of three different regimens of primaquine for the prevention of relapses of *Plasmodium vivax* malaria in the Amazon Basin of Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **91**, 18–26 (2014).
79. White, M. T., Shirreff, G., Karl, S., Ghani, A. C. & Mueller, I. Variation in relapse frequency and the transmission potential of *Plasmodium vivax* malaria. *Proc R Soc B* **283**, 20160048 (2016).
80. Lover, A. A. & Coker, R. J. Quantifying effect of geographic location on epidemiology of *Plasmodium vivax* malaria. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 1058–1065 (2013).
81. Battle, K. E. *et al.* Geographical variation in *Plasmodium vivax* relapse. *Malar. J.* **13**, 144 (2014).
82. White, N. J. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Malar. J.* **10**, 297 (2011).
83. Mosha, J. F. *et al.* Epidemiology of subpatent *Plasmodium falciparum* infection: implications for detection of hotspots with imperfect diagnostics. *Malar. J.* **12**, 221 (2013).
84. Villarreal-Treviño, C. *et al.* Larval habitat characterization of *Anopheles darlingi* from its northernmost geographical distribution in Chiapas, Mexico. *Malar. J.* **14**, (2015).
85. Hiwat, H. & Bretas, G. Ecology of *Anopheles darlingi* Root with respect to vector importance: a review. *Parasit. Vectors* **4**, 177 (2011).
86. Rozendaal, J. A. Relations between *Anopheles darlingi* breeding habitats, rainfall, river level and malaria transmission rates in the rain forest of Suriname. *Med. Vet. Entomol.* **6**, 16–22 (1992).
87. Charlwood, J. D. Biological variation in *Anopheles darlingi* Root. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **91**, 391–398 (1996).

88. Rejmánková, E., Rubio-Palis, Y. & Villegas, L. Larval habitats of anopheline mosquitoes in the Upper Orinoco, Venezuela. *J. Vector Ecol. J. Soc. Vector Ecol.* **24**, 130–137 (1999).
89. Sinka, M. E. *et al.* The dominant Anopheles vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasit. Vectors* **3**, 72 (2010).
90. Vittor, A. Y. *et al.* The effect of deforestation on the human-biting rate of Anopheles darlingi, the primary vector of Falciparum malaria in the Peruvian Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **74**, 3–11 (2006).
91. Vittor, A. Y. *et al.* Linking deforestation to malaria in the Amazon: characterization of the breeding habitat of the principal malaria vector, Anopheles darlingi. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **81**, 5–12 (2009).
92. Singer, B. H. & de Castro, M. C. Agricultural colonization and malaria on the Amazon frontier. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **954**, 184–222 (2001).
93. Instituto Nacional de Estadística e Informática: Perú. *Características de los Grupos Étnicos de la Amazonía Peruana y del Espacio Geográfico en el que Residen*. (Instituto Nacional de Estadística e Informática, 2011).
94. WHO Expert Committee on Malaria. Twelfth report. *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.* **324**, 3–48 (1966).
95. Le Menach, A. *et al.* Travel risk, malaria importation and malaria transmission in Zanzibar. *Sci. Rep.* **1**, (2011).
96. Tauil, P. L. The prospect of eliminating malaria transmission in some regions of Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **106**, 105–106 (2011).
97. Naranjo-Díaz, N., Conn, J. E. & Correa, M. M. Behavior and population structure of Anopheles darlingi in Colombia. *Infect. Genet. Evol.* **39**, 64–73 (2016).
98. Lo, E. *et al.* Low Parasitemia in Submicroscopic Infections Significantly Impacts Malaria Diagnostic Sensitivity in the Highlands of Western Kenya. *PLoS ONE* **10**, e0121763 (2015).
99. Koepfli, C. *et al.* Blood-Stage Parasitaemia and Age Determine Plasmodium falciparum and P. vivax Gametocytaemia in Papua New Guinea. *PLOS ONE* **10**, e0126747 (2015).
100. Motshoge, T. *et al.* Molecular evidence of high rates of asymptomatic P. vivax infection and very low P. falciparum malaria in Botswana. *BMC Infect. Dis.* **16**, 520 (2016).
101. Golassa, L. *et al.* Microscopic and molecular evidence of the presence of asymptomatic Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax infections in an area with low, seasonal and unstable malaria transmission in Ethiopia. *BMC Infect. Dis.* **15**, 310 (2015).
102. Worku, L., Damtie, D., Endris, M., Getie, S. & Aemero, M. Asymptomatic Malaria and Associated Risk Factors among School Children in Sanja Town, Northwest Ethiopia. *Int. Sch. Res. Not.* **2014**, e303269 (2014).
103. Sutton, P. L., Torres, L. P. & Branch, O. H. Sexual recombination is a signature of a persisting malaria epidemic in Peru. *Malar. J.* **10**, 329 (2011).
104. Hahn, M. B., Gangnon, R. E., Barcellos, C., Asner, G. P. & Patz, J. A. Influence of Deforestation, Logging, and Fire on Malaria in the Brazilian Amazon. *PLOS ONE* **9**, e85725 (2014).

105. Brunson, C., Fotheringham, A. S. & Charlton, M. E. Geographically Weighted Regression: A Method for Exploring Spatial Nonstationarity. *Geogr. Anal.* **28**, 281–298 (1996).
106. Grillet, M.-E., Barrera, R., Martínez, J.-E., Berti, J. & Fortin, M.-J. Disentangling the effect of local and global spatial variation on a mosquito-borne infection in a neotropical heterogeneous environment. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **82**, 194–201 (2010).
107. Cheng, E. M. Y., Atkinson, P. M. & Shahani, A. K. Elucidating the spatially varying relation between cervical cancer and socio-economic conditions in England. *Int. J. Health Geogr.* **10**, 51 (2011).
108. Leyk, S., Norlund, P. U. & Nuckols, J. R. Robust assessment of spatial non-stationarity in model associations related to pediatric mortality due to diarrheal disease in Brazil. *Spat. Spatio-Temporal Epidemiol.* **3**, 95–105 (2012).
109. Gatton, M. L. & Cheng, Q. Modeling the Development of Acquired Clinical Immunity to Plasmodium falciparum Malaria. *Infect. Immun.* **72**, 6538–6545 (2004).
110. Doolan, D. L., Dobaño, C. & Baird, J. K. Acquired Immunity to Malaria. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 13–36 (2009).
111. West, P. A. *et al.* Enhanced Protection against Malaria by Indoor Residual Spraying in Addition to Insecticide Treated Nets: Is It Dependent on Transmission Intensity or Net Usage? *PLOS ONE* **10**, e0115661 (2015).
112. World Health Organization. *Malaria Elimination: A Field Manual for Low and Moderate Endemic Countries.* (WHO, 2007).
113. World Health Organization. *Disease surveillance for malaria elimination.* (WHO, 2012).
114. Gushulak, B. D. & MacPherson, D. W. Globalization of Infectious Diseases: The Impact of Migration. *Clin. Infect. Dis.* **38**, 1742–1748 (2004).
115. McMichael, A. J. & Beaglehole, R. The changing global context of public health. *Lancet Lond. Engl.* **356**, 495–499 (2000).
116. Sturrock, H. J. W., Roberts, K. W., Wegbreit, J., Ohrt, C. & Gosling, R. D. Tackling Imported Malaria: An Elimination Endgame. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **93**, 139–144 (2015).
117. Bradley, J. *et al.* Infection importation: a key challenge to malaria elimination on Bioko Island, Equatorial Guinea. *Malar. J.* **14**, 46 (2015).
118. Imwong, M. *et al.* The First Plasmodium vivax Relapses of Life Are Usually Genetically Homologous. *J. Infect. Dis.* **205**, 680–683 (2012).
119. Stoddard, S. T. *et al.* The role of human movement in the transmission of vector-borne pathogens. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **3**, e481 (2009).
120. Cosner, C. *et al.* The effects of human movement on the persistence of vector-borne diseases. *J. Theor. Biol.* **258**, 550–560 (2009).
121. Wesolowski, A. *et al.* Quantifying the Impact of Human Mobility on Malaria. *Science* **338**, 267–270 (2012).
122. Wesolowski, A. *et al.* Quantifying travel behavior for infectious disease research: a comparison of data from surveys and mobile phones. *Sci. Rep.* **4**, (2014).

123. Tatem, A. J. *et al.* Integrating rapid risk mapping and mobile phone call record data for strategic malaria elimination planning. *Malar. J.* **13**, 52 (2014).
124. Pindolia, D. K. *et al.* Human movement data for malaria control and elimination strategic planning. *Malar. J.* **11**, 205 (2012).
125. Guyant, P. *et al.* Malaria and the mobile and migrant population in Cambodia: a population movement framework to inform strategies for malaria control and elimination. *Malar. J.* **14**, 252 (2015).
126. Baayen, R. H., Davidson, D. J. & Bates, D. M. Mixed-effects modeling with crossed random effects for subjects and items. *J. Mem. Lang.* **59**, 390–412 (2008).
127. Ibrahim, J. G. & Molenberghs, G. Missing data methods in longitudinal studies: a review. *Test Madr. Spain* **18**, 1–43 (2009).

TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Características basales de la población de estudio. Las proporciones están expresadas en a) nivel individual, donde las variables tiempo-dependientes fueron colapsadas si el individuo tenía al menos un evento positivo en alguna encuesta DAC y b) nivel de hogar, donde las variables de nivel individual se colapsaron en base a si al menos un individuo en el hogar tiene la característica de referencia.

Características	% Individuos					% Hogares				
	GC n=92 (%)	LI n=298 (%)	PE n=99 (%)	UM n=331 (%)	Total n=820 (%)	GC N=19 (%)	LI N=56 (%)	PE N=20 (%)	UM N=59 (%)	Total N=154 (%)
VARIABLES DE NIVEL TIEMPO-DEPENDIENTE										
Parasitemia de <i>P. vivax</i> por PCR										
Positivo	27 (29.4)	151 (50.7)	38 (38.4)	170 (51.4)	386 (47.1)	15 (78.9)	49 (87.5)	16 (80.0)	52 (88.1)	132 (85.7)
Negativo	65 (70.6)	147 (49.3)	61 (61.6)	161 (48.6)	434 (52.9)	4 (21.1)	7 (12.5)	4 (20.0)	7 (11.9)	22 (14.3)
Fiebre										
Positivo	18 (19.6)	34 (11.4)	4 (4.0)	46 (13.9)	102 (12.4)	10 (52.6)	17 (30.4)	3 (15.0)	24 (40.7)	54 (35.1)
Negativo	74 (80.4)	264 (88.6)	95 (96.0)	285 (86.1)	718 (87.6)	9 (47.4)	39 (69.6)	17 (85.0)	35 (59.3)	100 (64.9)
Viaje en el último mes										
Positivo	18 (19.6)	33 (11.1)	20 (20.2)	25 (7.5)	96 (11.7)	11 (57.9)	20 (35.7)	9 (45.0)	16 (27.1)	56 (36.4)
Negativo	74 (80.4)	265 (88.9)	79 (79.8)	306 (92.5)	724 (88.3)	8 (42.1)	36 (64.3)	11 (55.0)	43 (72.9)	98 (63.6)
VARIABLES DE NIVEL INDIVIDUAL										
Sexo										
Masculino	43 (46.7)	159 (53.4)	54 (54.5)	174 (52.5)	430 (52.4)	18 (94.7)	54 (96.4)	18 (90.0)	59 (100.0)	149 (96.7)
Femenino	49 (53.3)	139 (46.6)	45 (45.4)	157 (47.4)	390 (47.6)	1 (5.3)	2 (3.6)	2 (10.0)	0 (00.0)	5 (3.3)
Grupos de edad (años)										
< 15	41 (44.6)	132 (44.3)	49 (49.5)	178 (53.8)	400 (48.8)	15 (78.9)	41 (73.2)	16 (80.0)	50 (84.7)	122 (79.2)
≥ 15	51 (55.4)	166 (55.7)	50 (50.5)	153 (46.2)	420 (51.2)	4 (21.1)	15 (26.8)	4 (20.0)	9 (15.3)	32 (20.8)
Educación										
Ninguno o primaria	25 (27.2)	98 (32.9)	26 (26.3)	94 (28.4)	243 (29.6)	14 (73.7)	45 (80.4)	16 (80.0)	44 (74.6)	119 (77.3)
Secundaria o superior	67 (72.8)	200 (67.1)	73 (73.7)	237 (71.6)	577 (70.4)	5 (26.3)	11 (19.6)	4 (20.0)	15 (25.4)	35 (22.7)
Ocupación Exterior (Maderero, Pescador and Agricult.)										
Si	47 (51.1)	140 (47.0)	42 (42.4)	104 (31.4)	333 (40.6)	18 (94.7)	53 (94.6)	19 (95.0)	49 (83.0)	139 (90.3)
No	45 (48.9)	158 (53.0)	57 (57.6)	227 (68.6)	487 (59.4)	1 (5.3)	3 (5.4)	1 (5.0)	10 (17.0)	15 (9.7)
VARIABLES DE NIVEL HOGAR										
Clúster de alto riesgo °										
Si	72 (78.3)	0 (0.0)	25 (25.2)	199 (60.1)	296 (36.1)	14 (73.7)	0 (0.0)	5 (25.0)	35 (59.3)	54 (35.1)

No	20 (21.7)	298 (100.0)	74 (74.7)	132 (39.9)	524 (63.9)	5 (26.3)	56 (100.0)	15 (75.0)	24 (40.7)	100 (64.9)
Estructura de la vivienda										
Casas abiertas	34 (37.4)	107 (36.4)	57 (57.6)	115 (34.7)	313 (38.4)	8 (44.4)	21 (38.2)	11 (55.0)	20 (33.9)	60 (39.5)
Al menos un cuarto cerrado	57 (62.6)	187 (63.6)	42 (42.4)	216 (65.3)	502 (61.6)	10 (55.6)	34 (61.8)	9 (45.0)	39 (66.1)	92 (60.5)
Material de paredes										
Cemento o madera	70 (76.1)	256 (85.9)	77 (77.8)	244 (73.7)	647 (78.9)	15 (79.0)	48 (85.7)	16 (80.0)	42 (71.2)	121 (78.6)
Palma, hoja, caña, calamina	22 (23.9)	42 (14.1)	22 (22.2)	87 (26.3)	173 (21.1)	4 (21.0)	8 (14.3)	4 (20.0)	17 (28.8)	33 (21.4)
Material del techo †										
Calamina	31 (34.1)	12 (4.1)	0 (0.0)	141 (42.6)	184 (22.6)	5 (27.8)	5 (9.1)	0 (0.0)	24 (40.7)	34 (22.4)
Palma, hoja, caña	60 (65.9)	282 (95.9)	99 (100.0)	190 (57.4)	631 (77.4)	13 (72.2)	50 (90.9)	20 (100.0)	35 (59.3)	118 (77.6)
Fumigación IRS * †										
Si	77 (84.6)	266 (90.5)	89 (89.9)	325 (99.7)	757 (93.5)	15 (83.3)	47 (85.5)	18 (90.0)	56 (98.3)	136 (90.7)
No	14 (15.4)	28 (9.5)	10 (10.1)	1 (0.3)	53 (6.5)	3 (16.7)	8 (14.5)	2 (10.0)	1 (1.7)	14 (9.3)
Electricidad										
Si	24 (26.4)	80 (27.2)	31 (31.3)	269 (81.3)	404 (49.6)	4 (22.2)	13 (23.6)	5 (25.0)	45 (76.3)	67 (44.1)
No	67 (73.6)	214 (72.8)	69 (69.7)	62 (18.7)	411 (50.4)	14 (77.8)	42 (76.4)	15 (75.0)	14 (23.7)	85 (55.9)
Animales en la vivienda † +										
Si	24 (26.4)	107 (36.4)	43 (43.4)	107 (32.3)	281 (34.5)	5 (27.8)	22 (40.0)	8 (40.0)	17 (28.8)	52 (34.2)
No	67 (73.6)	187 (63.6)	56 (56.6)	224 (67.7)	534 (65.5)	13 (72.2)	33 (60.0)	12 (60.0)	42 (71.2)	100 (65.8)

GC=Gamitanacocha; LI=Libertad; PE=Primero de Enero; UM=Urco Miraña; † Variables con datos incompletos; ° Incluido vecindario de 550m; * Indoor Residual Spraying; + Pollos, vacas, perros o gatos.

Tabla 2. Prevalencia parasitaria de malaria (por microscopia and PCR) por muestras e individuos.

Características	GC		LI		PE		UM		Total	
	Mues. n=265 (%)	Ind.^ n=92 (%)	Mues. n=986 (%)	Ind.^ n=298 (%)	Mues. n=330 (%)	Ind.^ n=99 (%)	Mues. n=1204 (%)	Ind.^ n=331 (%)	Mues. n=2785 (%)	Ind.^ n=820 (%)
Parasitemia de <i>Plasmodium</i> spp. por qPCR										
Positivo	48 (18.1)	34 (37.0)	314 (31.8)	183 (61.4)	67 (20.3)	44 (44.4)	282 (23.4)	190 (57.4)	711 (25.5)	451 (55.0)
Negativo	217 (81.9)	58 (63.0)	672 (68.2)	115 (38.6)	263 (79.7)	55 (55.6)	922 (76.6)	141 (42.6)	2074 (74.5)	369 (45.0)
Parasitemia de <i>P. vivax</i> por qPCR										
Positivo	39 (14.7)	27 (29.4)	236 (23.9)	151 (50.7)	59 (17.9)	38 (38.4)	255 (21.2)	170 (51.4)	589 (21.1)	386 (47.1)
Negativo	226 (85.3)	65 (70.6)	750 (76.1)	147 (49.3)	271 (82.1)	61 (61.6)	949 (78.8)	161 (48.6)	2196 (78.9)	434 (52.9)
Parasitemia de <i>P. falciparum</i> por qPCR										
Positivo	9 (3.4)	8 (8.7)	78 (7.9)	43 (14.4)	8 (2.4)	7 (7.1)	27 (2.2)	27 (8.2)	122 (4.4)	85 (10.4)
Negativo	256 (96.6)	84 (91.3)	908 (92.1)	255 (85.6)	322 (97.6)	92 (92.9)	1177 (97.76)	304 (91.8)	2663 (95.6)	735 (89.6)
Resultado de Microscopia †										
<i>P. falciparum</i>	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (0.6)	6 (2.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (0.2)	6 (0.7)
<i>P. vivax</i>	1 (0.4)	1 (1.1)	24 (2.4)	24 (8.1)	13 (4.0)	11 (11.1)	51 (4.2)	50 (15.1)	89 (3.2)	86 (10.5)
Negativo	263 (99.6)	91 (98.9)	949 (96.9)	266 (89.9)	311 (96.0)	88 (88.9)	1150 (95.8)	281 (84.9)	2673 (96.6)	726 (88.8)

GC=Gamitanacocha; LI=Libertad; PE=Primero de Enero; UM=Urco Miraflores; Mues.= Muestras; Ind.= Individuos; ^ Al menos una muestra positiva en las 4 encuestas DAC; † Variables con datos incompletos.

Tabla 3. Efectos fijos de los modelos multi-comunidad y comunidad-especifico bivariados de parasitemia por *P. vivax*

	Modelo multi-comunidad			Modelo comunidad-especifico											
	RP	IC 95%	valor-p	GC			LI			PE			UM		
				RP	IC 95%	valor-p	RP	IC 95%	valor-p	RP	IC 95%	valor-p	RP	IC 95%	valor-p
Modelo nulo															
Constante	0.18	(0.16 - 0.20)	<0.001	0.12	(0.08 - 0.17)	<0.001	0.20	(0.17 - 0.24)	<0.001	0.14	(0.10 - 0.19)	<0.001	0.18	(0.15 - 0.21)	<0.001
VARIABLES DE NIVEL TIEMPO-DEPENDIENTE															
Historia de viaje (Ref=No)															
Si	1.06	(0.76 - 1.49)	0.714	0.85	(0.26 - 2.83)	0.796	0.71	(0.37 - 1.35)	0.300	2.04	(0.99 - 4.20)	0.052 *	1.28	(0.74 - 2.19)	0.3
Fiebre (Ref=No)															
Si	1.68	(1.09 - 2.59)	0.018 **	1.06	(0.25 - 4.45)	0.942	1.33	(0.62 - 2.85)	0.455	-	-	-	2.57	(1.46 - 4.53)	0.0
VARIABLES DE NIVEL INDIVIDUAL															
Sexo (Ref=Femenino)															
Masculino	0.99	(0.81 - 1.21)	0.937	1.26	(0.58 - 2.66)	0.572	0.89	(0.65 - 1.22)	0.471	1.35	(0.70 - 2.58)	0.365	0.95	(0.70 - 1.29)	0.7
Grupo de edad (Ref=<15 años)															
15 - 39.9	1.18	(0.94 - 1.49)	0.148 *	2.11	(0.91 - 4.89)	0.082 *	1.01	(0.70 - 1.45)	0.942	1.33	(0.65 - 2.75)	0.432	1.19	(0.83 - 1.70)	0.3
≥ 40	0.97	(0.74 - 1.26)	0.838	1.06	(0.33 - 3.40)	0.927	0.70	(0.45 - 1.07)	0.100	1.66	(0.72 - 3.86)	0.235	1.10	(0.74 - 1.62)	0.6
Educación (Ref=Ninguno)															
Primaria	1.30	(1.02 - 1.65)	0.030 **	2.89	(0.99 - 8.042)	0.052 *	1.14	(0.80 - 1.63)	0.465	1.54	(0.67 - 3.59)	0.308	1.33	(0.91 - 1.94)	0.1
Secundaria o superior	1.28	(0.94 - 1.73)	0.116 *	1.17	(0.21 - 6.37)	0.859	1.21	(0.67 - 2.16)	0.527	2.68	(0.94 - 7.63)	0.065 *	1.24	(0.81 - 1.89)	0.3
Ocupación (Ref=No Maderero, pescador y agricul.)															
Si	1.16	(0.95 - 1.42)	0.154 *	1.69	(0.77 - 3.70)	0.195 *	0.89	(0.64 - 1.22)	0.470	1.73	(0.92 - 3.28)	0.090 *	1.28	(0.94 - 1.76)	0.1
VARIABLES DE NIVEL HOGAR															
Clúster de alto riesgo (Ref=No)															
Si	1.10	(0.88 - 1.34)	0.412	1.97	(0.68 - 5.70)	0.210	-	(-)	-	2.09	(1.09 - 4.00)	0.027 **	1.24	(0.90 - 1.71)	0.1
Estructura de la vivienda (Ref=Abierta)															
Al menos un cuarto cerrado	0.93	(0.76 - 1.15)	0.527	1.16	(0.52 - 2.60)	0.719	0.80	(0.58 - 1.10)	0.182 *	0.83	(0.43 - 1.59)	0.585	0.99	(0.71 - 1.39)	0.9
Material paredes (Ref=Cemento o madera)															
Palma, hoja, caña, calamina	1.06	(0.83 - 1.35)	0.651	2.08	(0.93 - 4.62)	0.073 *	0.90	(0.57 - 1.41)	0.644	0.82	(0.36 - 1.87)	0.638	1.13	(0.79 - 1.61)	0.5
Material techo (Ref=Calamina)															
Palma, hoja, caña	1.10	(0.86 - 1.41)	0.438	0.56	(0.26 - 1.22)	0.147 *	1.14	(0.50 - 2.58)	0.752	-	-	-	1.21	(0.88 - 1.67)	0.2
Fumigación IRS (Ref=Si)															
No	0.91	(0.58 - 1.44)	0.710	1.89	(0.76 - 4.69)	0.172 *	0.83	(0.45 - 1.54)	0.562	0.54	(0.13 - 2.25)	0.399	1.84	(0.25 - 13.47)	0.5
Electricidad (Ref=No)															
Si	0.96	(0.79 - 1.18)	0.764	0.63	(0.25 - 1.56)	0.319	1.13	(0.80 - 1.60)	0.488	0.77	(0.38 - 1.55)	0.467	0.88	(0.59 - 1.31)	0.5
Animales (Ref=Si)															
No	1.10	(0.88 - 1.36)	0.400	0.95	(0.38 - 2.36)	0.907	0.99	(0.71 - 1.37)	0.932	0.92	(0.49 - 1.74)	0.803	1.35	(0.95 - 1.91)	0.0

GC=Gamitanacocha; LI=Libertad; PE=Primero de Enero; UM=Urco Miraflores; Modelos de Poisson con efectos aleatorios; RP= Razón de Prevalencias; valor-p del test de Wald; * valor-p<0.2; ** valor-p<0.05

Tabla 4. Efectos fijos del modelo multi-comunidad multivariado de parasitemias por

P. vivax.

	RPA	IC 95%	valor-p
Comunidad (Ref=LI)			
UM	0.58	(0.38 - 0.88)	0.007 **
PE	0.40	(0.20 - 0.81)	0.003 **
GC	0.29	(0.11 - 0.76)	0.003 **
Historia de viaje (Ref=No)			
Si	0.71	(0.44 - 1.15)	0.101 *
Viaje*comunidad			
Si*UM	1.63	(0.87 - 3.08)	0.090 *
Si*PE	2.93	(1.13 - 7.64)	0.028 **
Si*GC	0.93	(0.35 - 2.44)	0.267
Fiebre (Ref=No)			
Si	1.73	(1.11 - 2.71)	0.013 **
Grupos de Edad (Ref=<15 años)			
15 - 39.9	0.85	(0.66 - 1.10)	0.119 *
≥ 40	0.69	(0.49 - 0.98)	0.041 **
Educación (Ref=Ninguno)			
Primaria	1.27	(1.01 - 1.60)	0.040 **
Secundaria o superior	1.27	(0.96 - 1.68)	0.074 *
Ocupación (Ref=No un Maderero, pescador y agricultor)			
Si	1.04	(0.79 - 1.39)	0.256
Ocupación*comunidad			
Si*UM	1.52	(1.02 - 2.27)	0.041 **
Si*PE	1.73	(0.95 - 3.15)	0.064 *
Si*GC	2.07	(1.00 - 4.28)	0.050 **
Clúster de alto riesgo (Ref=No)			
Si	1.47	(1.09 - 1.98)	0.011 **

GC=Gamitanacocha; LI=Libertad; PE=Primero de Enero; UM=Urco Miraño; Modelos de Poisson con efectos aleatorios; RPA= Razón de prevalencias ajustado; valor-p y 95% IC ajustados por tasa de falsos descubrimientos (FDR); * valor-p<0.2; ** valor-p<0.05.

Tabla 5. Efectos fijos de los modelos comunidad-específicos multivariados de parasitemias por *P. vivax*.

	GC			LI			PE			UM		
	RPA	IC 95%	valor-p	RPA	IC 95%	valor-p	RPA	IC 95%	valor-p	RPA	IC 95%	valor-p
Historia de viaje (Ref=No)												
Si							3.11	(1.25 - 7.74)	0.011 **			
Fiebre (Ref=No)												
Si										2.64	(1.31 - 5.31)	0.002
Sexo (Ref=Femenino)												
Masculino							1.56	(0.93 - 2.61)	0.074 *			
Grupos de Edad (Ref=<15 años)												
15 - 39.9				1.09	(0.84 - 1.41)	0.196 *						
≥ 40				0.71	(0.50 - 1.02)	0.063 *						
Ocupación (Ref=No un Maderero, pescador y agricultor)												
Si	2.21	(1.01 - 4.84)	0.040 **				1.43	(0.88 - 2.31)	0.096 *	1.36	(1.01 - 1.82)	0.040
Clúster de alto riesgo (Ref=No)												
Si	2.22	(0.91 - 5.38)	0.069 *				2.96	(1.26 - 6.90)	0.009 **	1.24	(0.96 - 1.58)	0.076
Estructura de la vivienda (Ref=Abierta)												
Al menos un cuarto cerrado				0.81	(0.63 - 1.04)	0.076 *						
Material de paredes (Ref=cemento o madera)												
Palma, hoja, caña, calamina	3.11	(1.27 - 7.61)	0.013 **									
Fumigación IRS (Ref=Si)												
No	2.58	(1.04 - 6.42)	0.040 **									

GC=Gamitanacocha; LI=Libertad; PE=Primero de Enero; UM=Urco Miraño; Modelos de Poisson con efectos aleatorios; RPA= Razón de prevalencias ajustado; valor-p y 95% IC ajustados; tasa de falsos descubrimientos (FDR); * valor-p<0.2; ** valor-p<0.05.

Figura 1. Área de estudio en el distrito de Mazan, Departamento de Loreto, Amazonía Peruana. Distribución espacial de las comunidades de Gamitanacocha (GC, círculos verdes), Libertad (LI, círculos azules), Primero de Enero (PE, círculos amarillos) and Urco Miraño (UM, círculos rojos) en el distrito de Mazan.

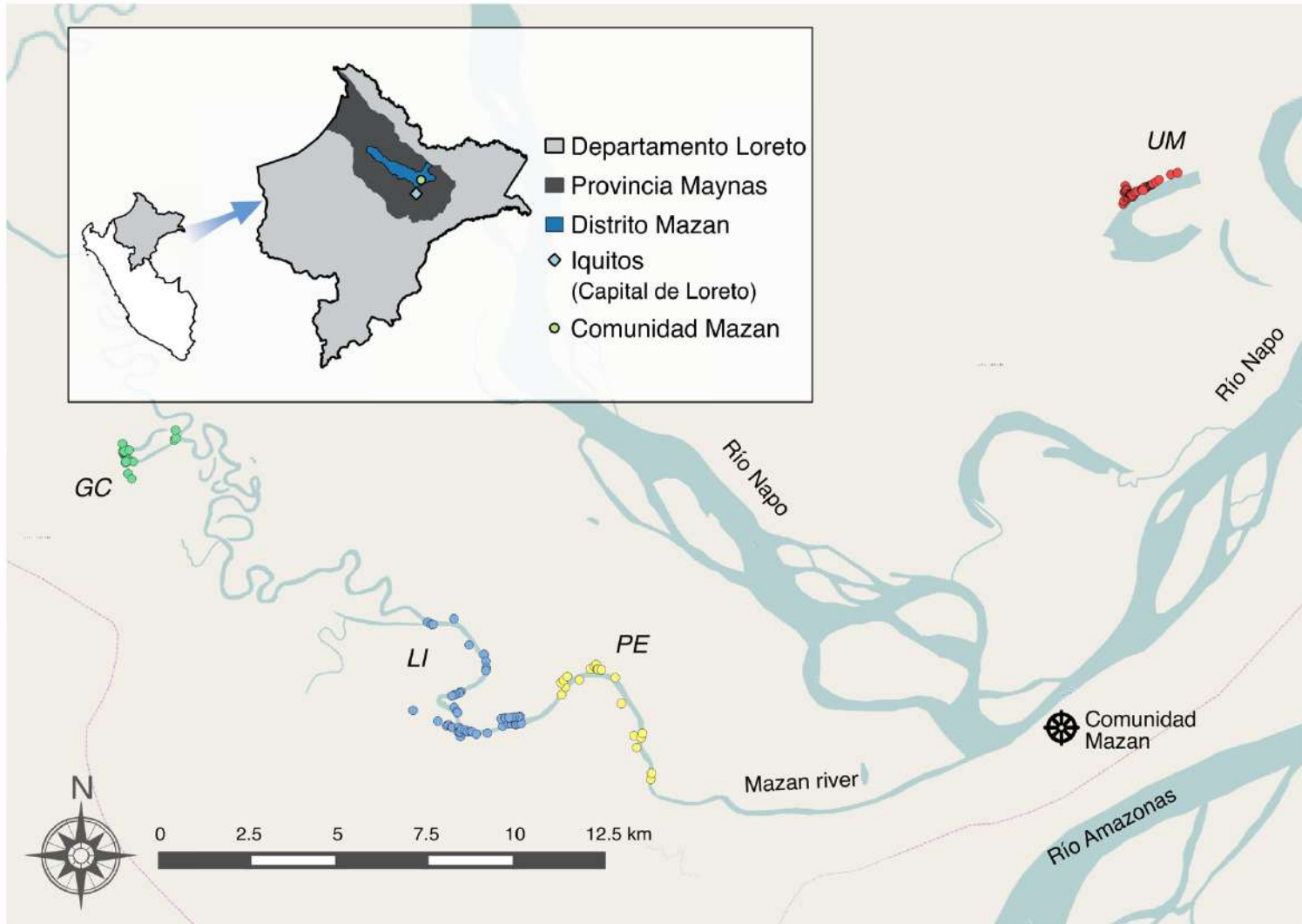


Figura 2. Distribución de las parasitemias por *P. vivax* y prevalencia parasitaria a lo largo de las 4 encuestas DAC. a) Número de individuos con parasitemias de *P. vivax* nuevas (barras gris claro), detectadas previamente (barras gris oscuro) y acumuladas (cuadrados celestes); y b) prevalencia parasitaria por microscopía (línea discontinua ploma) y qPCR (línea continua negra); y la proporción de parasitemias sub-microscópicas (SM, barras celestes) en cada encuesta DAC.

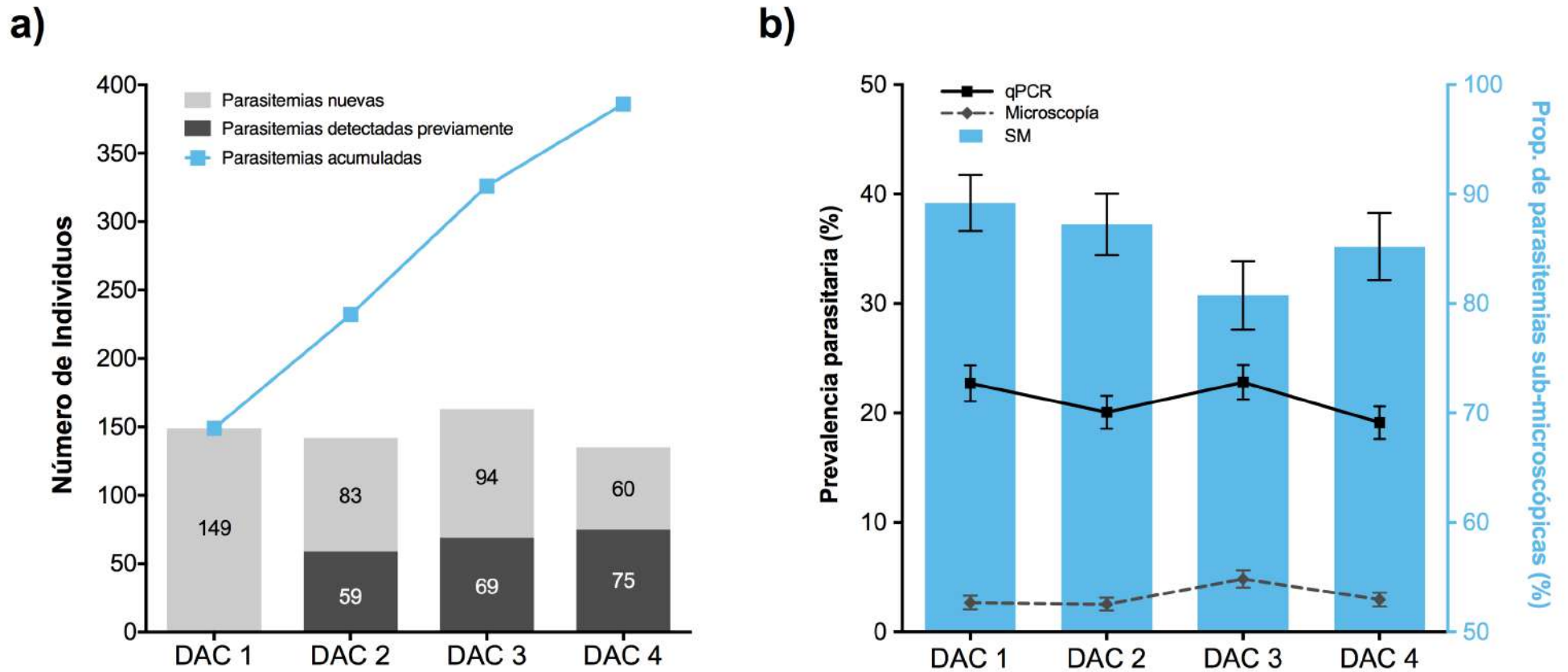


Figura 3. Proporción de participantes por vivienda con al menos una parasitemia por *P. vivax* a lo largo del seguimiento en: Gamitanacocha (GC), Libertad (LI), Primero de Enero (PE) y Urco Miraño (UM).

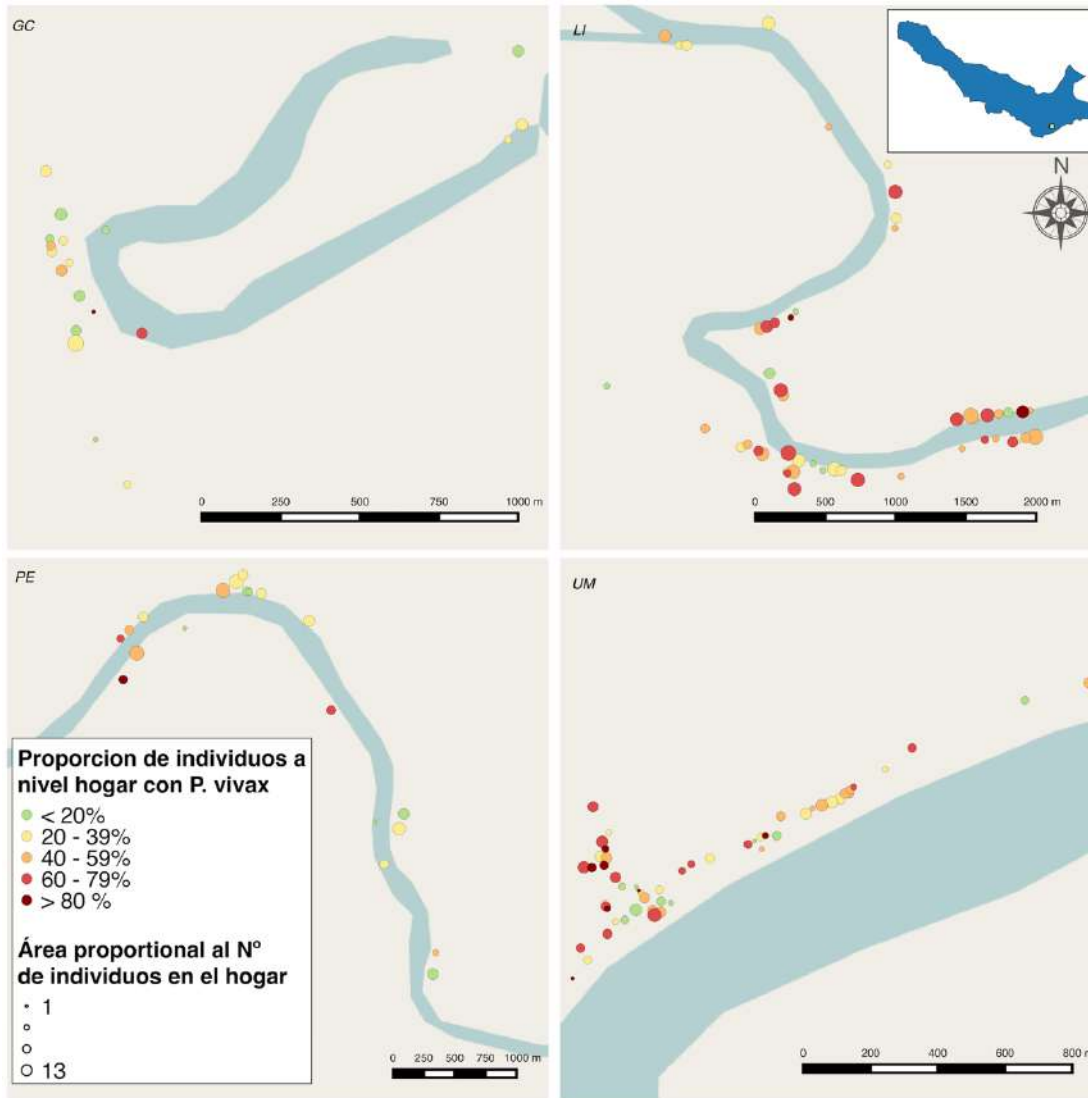
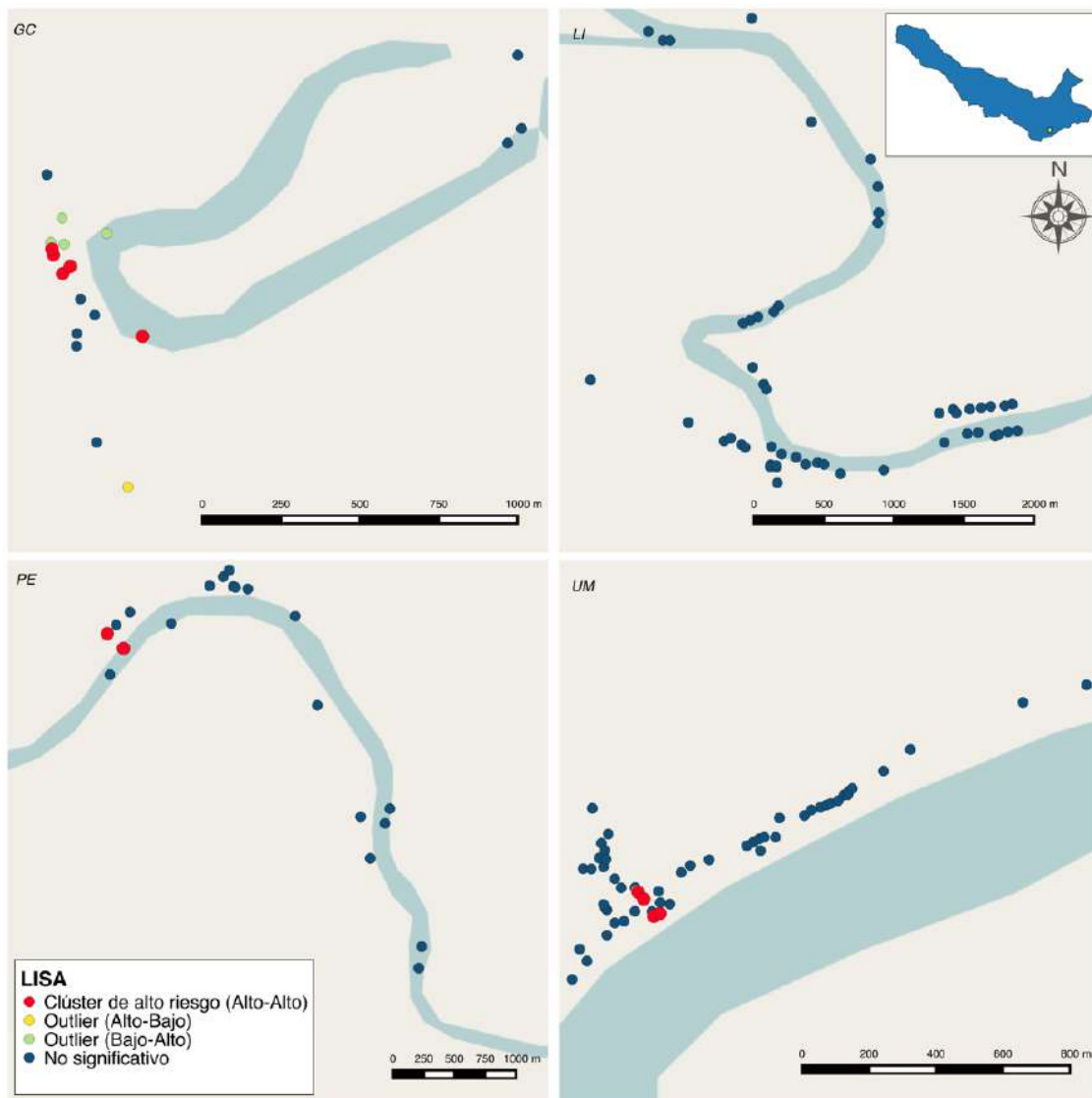


Figura 4. Análisis de agrupamiento por indicadores locales de asociación espacial (LISA) de las parasitemias por *P. vivax* en: Gamitanacocha (GC), Libertad (LI), Primero de Enero (PE) y Urco Miraño (UM).



MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla Suplementaria S1. Destinos comunes de registros de viajes auto-reportados por habitante de Gamitanacocha (GC), Libertad (LI), Primero de Enero (PE), and Urco Mirañó (UM).

Comunidades	GC	LI	PE	UM	Total
Individuos	N=18	N=33	N=20	N=25	N=96
Viajes	n=36 (%)	n=84 (%)	n=59 (%)	n=82 (%)	n=261 (%)
Destinos:					
Iquitos	2 (5.56)	7 (8.33)	5 (8.47)	47 (57.32)	61 (23.37)
Mazan	3 (8.33)	13 (15.48)	1 (1.69)	12 (14.63)	29 (11.11)
Quebradas [^]	10 (27.78)	60 (71.43)	38 (64.41)		108 (41.38)
Yurimaguas		1 (1.19)		4 (4.88)	5 (1.92)
Maucallacta	18 (50.00)				18 (6.90)
Paucarillo	2 (5.56)				2 (0.77)
Pebas	1 (2.78)				1 (0.38)
14 de Julio		2 (2.38)			2 (0.77)
Inganoyata		1 (1.19)			1 (0.38)
Santa Cruz			14 (23.73)		14 (5.36)
Orosa River			1 (1.69)		1 (0.38)
Sucusari				2 (2.44)	2 (0.77)
Indiana				3 (3.66)	3 (1.15)
Palmeras				6 (7.32)	6 (2.30)
Pampa					
Hermoza				4 (4.88)	4 (1.53)
Santa Teresa				4 (4.88)	4 (1.53)

[^] Reportado por parker

Tabla Suplementaria S2. Efectos aleatorios de modelo multi-comunidad nulo y modelo multivariado para parasitemia por *P. vivax*.

	Var	IC 95%
Modelo Nulo		
Vivienda	0.0151	(0.00005 - 4.46881)
Individuo	0	(-)
Modelo Multi-comunidad		
Vivienda	0	(-)
Individuo	0	(-)

Modelos de Poisson de Efectos mixtos con solo interceptos aleatorios; Var= Varianza estimada por modelo de efectos mixtos.

Tabla Suplementaria S3. Efectos aleatorios de modelos comunidad-especificos nulo y modelo multivariado para parasitemia por *P. vivax*.

	GC		LI		PE		UM	
	Var	IC 95%	Var	IC 95%	Var	IC 95%	Var	IC 95%
Modelos Nulos								
Vivienda	0	(-)	0	(-)	0	(-)	0.0362	(0.153 - 0.2142)
Individuos	0	(-)	0	(-)	0	(-)	0	(-)
Modelos comunidad-especificos								
Vivienda	0	(-)	0	(-)	0	(-)	0.0219	(0.0001 - 5.0111)
Individuos	0	(-)	0	(-)	0	(-)	0.0000	(-)

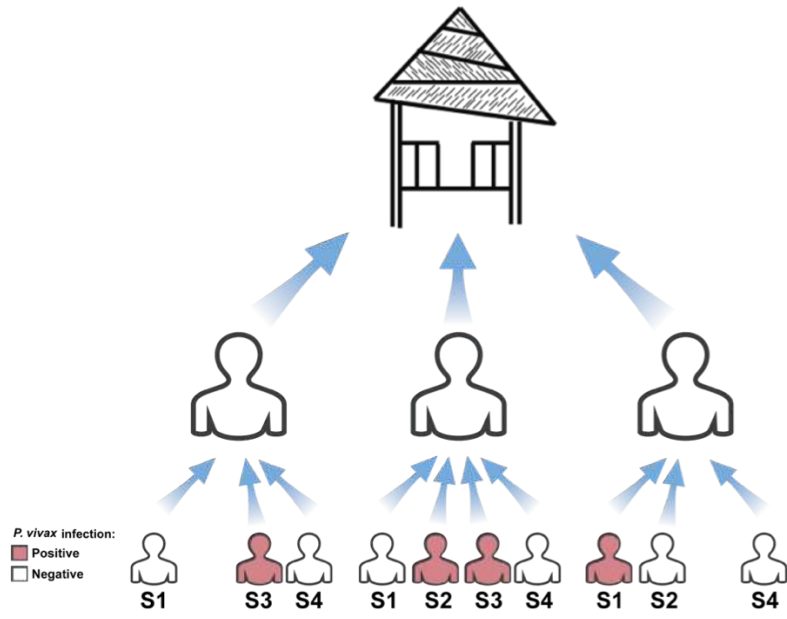
GC=Gamitanacocha; LI=Libertad; PE=Primero de Enero; UM=Urco Miraño; Modelos de Poisson de Efectos mixtos con solo interceptos aleatorios; Var= Varianza estimada por modelo de efectos mixtos.

Tabla Suplementaria S3. Efectos fijos del modelo multi-comunidad multivariado de parasitemias por *P. vivax* (colapsado a nivel individual).

	RPA	IC 95%	valor-p
Comunidad (Ref=LI)			
UM	0.71	(0.40 - 0.91)	0.011 **
PE	0.48	(0.28 - 0.85)	0.008 **
GC	0.34	(0.17 - 0.66)	0.002 **
Historia de viaje (Ref=No)			
Si	0.63	(0.34 - 1.19)	0.157 *
Viaje*comunidad			
Si*UM	1.72	(0.76 - 3.91)	0.123 *
Si*PE	2.41	(1.07 - 6.29)	0.041 **
Si*GC	1.25	(0.38 - 3.11)	0.316
Fiebre (Ref=No)			
Si	1.22	(1.01 - 2.64)	0.048 **
Grupos de Edad (Ref=<15 años)			
15 - 39.9	0.86	(0.60 - 1.23)	0.212
≥ 40	0.76	(0.50 - 0.99)	0.049 **
Educación (Ref=Ninguno)			
Primaria	1.26	(0.98 - 1.63)	0.075 *
Secundaria o superior	1.23	(0.87 - 1.74)	0.241 *
Ocupación (Ref=No un Maderero, pescador y agricultor)			
Si	1.05	(0.69 - 1.58)	0.427
Ocupación*comunidad			
Si*UM	1.35	(1.06 - 2.32)	0.039 **
Si*PE	1.57	(0.87 - 3.21)	0.117 *
Si*GC	1.65	(0.99 - 3.92)	0.052 *
Clúster de alto riesgo (Ref=No)			
Si	1.34	(1.01 - 1.80)	0.041 **

GC=Gamitanacocha; LI=Libertad; PE=Primero de Enero; UM=Urco Mirañó; Modelos de Poisson con efectos aleatorios; RPA= Razón de prevalencias ajustado; valor-p y 95% IC ajustados por tasa de falsos descubrimientos (FDR); * valor-p<0.2; ** valor-p<0.05.

Figura Suplementaria S1. Estructura multinivel de datos recolectados en el estudio



Nombre del nivel	Subíndice a nivel de índice	Variables medidas en cada miembro del nivel
Hogar [154 Viviendas]	k	Estructura de HH, material paredes, material techos, HH rociada, suministro energía, ganado y ubicación en grupo de alto riesgo.
Individuos [820 individuos]	j	Género, edad, educación, ocupación al aire libre.
Observaciones repetidas en el tiempo [hasta 4 encuestas (S)]	i	Historial de viaje, síntoma de fiebre, parasitemia de <i>P. vivax</i> por PCR.

HH=Hogar