

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA

“ALBERTO CAZORLA TALLERI”



Título:

**Características de las infecciones recurrentes submicroscópicas por
Plasmodium vivax detectadas durante un estudio cohorte de 3 años en
la Amazonía Peruana**

Tesis para optar el Título de Licenciado en Biología

Tesista:

Stefano Segundo Arturo Garcia Castillo

Asesora:

Dionicia Baziliza Gamboa Vilela, PhD.

Co-asesor:

Ángel Martín Rosas-Aguirre, PhD, MD.

Lima - Perú

2021

Asesora:

Dionicia Baziliza Gamboa Vilela, Msc, PhD.

Departamento de Ciencias Celulares y Moleculares,

Faculta de Ciencias y Filosofía

Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt

Universidad Peruana Cayetano Heredia

Co-asesor:

Ángel Martin Rosas-Aguirre, Msc, PhD, MD.

Research Institute of Health and Society

Université catholique de Louvain

Brussels, Belgium

DEDICATORIA

A mi abuelos, Rosa y Segundo.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseo agradecer a mi mentora Dionicia Gamboa, quien me ofreció un espacio de confianza, y apoyo desde el primer momento que ingrese al laboratorio. Sin su guía no habría podido llegar a este punto en mi carrera como investigador. Ha sido y sigue siendo un honor y privilegio trabajar junto a ella. Asimismo, quisiera agradecer a Ángel Rosas-Aguirre por su paciencia y asesoría a lo largo de la experiencia de escribir una tesis. Ha sido un camino largo y difícil, y siempre estaré agradecido.

De igual forma quiero agradecer a todos los miembros del laboratorio de Malaria por su amabilidad. Me hicieron sentir bienvenido y parte del grupo desde el inicio, y ese sentimiento siempre lo llevaré conmigo. También un agradecimiento especial a Joaquín y Caroline, mis mejores amigos. Sin su apoyo, compañía y ocurrencias, mi vida no sería igual. A lado de ellos, la ciencia es mucho más divertida.

Por último, gracias a toda mi familia. A pesar de no ser su área de conocimiento, nunca dejaron de escuchar mis historias sobre malaria, mosquitos y primates. Sofia, mi mamá, quien siempre está conmigo en cualquier decisión o camino que tome, ha sido mi modelo a seguir. Por ella estoy aquí. Mis hermanos, Mishell y Claudio, que a pesar nunca entendieron lo que hago, son los que me motivan a seguir creciendo. Por ellos, continuo.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue financiado por el proyecto “Translational Research Development for Endemic Infectious Diseases of Amazonia”- FOGARTY (2D43TW007120-11A1), y el proyecto “AMAZONIA-International Center of Excellence for Malaria Research” (5U19AI089681, NIH-USA).

INDICE

CAPÍTULO I

INTRODUCCION

1.1	Antecedentes	12
1.1.1	Epidemiología de la Malaria: impacto en zonas endémicas.....	12
1.1.2	Malaria en la Amazonia Peruana: persistencia en la transmisión	14
1.1.3	Biología de <i>Plasmodium vivax</i> : ciclo de vida y tratamiento	16
1.1.4	Infecciones submicroscópicas: retos en el diagnóstico	18
1.1.5	Recurrencia de infecciones: biología del relapso, recrudescencia y reinfección.....	19
1.1.6	Tiempo de detección de infecciones: dinámica y evolución.	22
1.2	Planteamiento del Problema	24
1.3	Justificación del estudio.....	25

CAPÍTULO II

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2.1	Pregunta de investigación	26
2.2	Hipótesis	26
2.3	Objetivos.....	26
2.3.1	Objetivos Generales	26
2.3.2	Objetivos Específicos.....	26

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1	Área de estudio	28
-----	-----------------------	----

3.2 Diseño de estudio.....	29
3.3 Análisis estadísticos.....	29
3.4 Consideraciones éticas.....	32
CAPÍTULO IV	
RESULTADOS	
4.1 Características sociodemográficas de la población estudio.....	33
4.2 Tiempo de infección y características de las infecciones recurrentes por <i>Plasmodium vivax</i>	36
4.3 Factores asociados al tiempo de detección de una infección recurrente.....	40
4.4 Evolución de las infecciones submicroscópicas.....	42
CAPÍTULO V	
DISCUSIÓN.....	45
CAPÍTULO VII	
CONCLUSIONES.....	51
CAPÍTULO VII	
RECOMENDACIONES Y LIMITACIONES.....	52
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	54
MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	60

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Características sociodemográficas y epidemiológicas de los participantes del estudio en las comunidades de Cahuide y Lupuna (n = 343)

Tabla 2. Características básicas de los hogares de los participantes del estudio (n = 182).

Tabla 3. Características de las recurrencias por *P. vivax* entre enero de 2013 y diciembre de 2015.

Tabla 4. Análisis de factores de riesgo ajustado por variables para la primera recurrencia y para todas las recurrencias según la detección de PCR y microscopía

Tabla 6. Incidencia de evolución de infecciones submicroscópicas para *P. vivax* durante la cohorte de 3 años (n = 343).

Tabla S1. Número de personas e infecciones en riesgo de permanecer libre de recurrencias detectado por microscopía y PCR según la comunidad, el grupo etario, sexo, número de episodios previos de malaria y ocupación.

Tabla S2. Análisis univariados de factores de riesgo para la primera recurrencia y para todas las recurrencias según la detección por PCR y por microscopía.

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Número de casos de malaria en la región de Loreto desde el 2010 hasta el 2021.

Figura 2. Ciclo biológico de *Plasmodium vivax* en el vector y el hospedero.

Figura 3. Dinámica de los tipos de infecciones recurrentes por *Plasmodium vivax*.

Figura 3. Mapa de las áreas de estudio.

Figura 5. Diagrama de los escenarios estudiados sobre la evolución de las infecciones submicroscópicas.

Figura 6. Probabilidad de Kaplan-Meier de permanecer libre de la primera y todas las recurrencias por *Plasmodium vivax* según el método de detección.

Figura 7. Riesgo acumulado de presentar infecciones recurrentes por *Plasmodium vivax* según la comunidad, el grupo etario, y el número de episodios previos de malaria en su vida a través de la detección por microscopía y PCR.

Figura 8. Factores de riesgo asociados al tiempo de detección de recurrencias por *Plasmodium vivax* a través de microscopía y PCR.

Figura 9. Persistencia y tiempo de evolución de las infecciones submicroscópicas a infección indetectables.

Figure S1. Riesgo acumulado de presentar infecciones recurrentes por *Plasmodium vivax* según el sexo, la ocupación, y el número de episodios previos de malaria en el último año a través de la detección por microscopía y PCR.

RESUMEN

Introducción: En la Amazonia peruana, la transmisión de la malaria por *Plasmodium vivax* se mantiene debido a que 1) las recurrencias en esta región son extremadamente comunes; contribuyendo al incremento de los casos submicroscópicos y 2) estas infecciones no son detectadas por el Ministerio de Salud, perpetuando así el ciclo de transmisión silente. En este contexto, entender la duración y evolución de estas infecciones recurrentes submicroscópicas nos permitiría comprender su impacto en la persistencia de la malaria. **Métodos:** Se realizó un análisis retrospectivo de datos clínicos y epidemiológicos mensuales de dos comunidades de Loreto (Cahuide y Lupuna) desde el año 2013 al 2015. Para determinar la probabilidad de permanecer libre de recurrencias se realizó análisis de supervivencia. Asimismo, se buscó la asociación de factores con el tiempo de detección a través de análisis de regresión de Cox. Por último, se determinó la densidad de incidencia (DI) de la evolución de infecciones submicroscópicas a una infección microscópica y a una infección indetectable. **Resultados:** Durante los tres años de seguimiento, cerca del 57% (195/343) de los individuos presentó al menos una recurrencia, de los cuales el 30.79% (93/195) ocurrió tras los tres primeros meses luego de una infección microscópica. La probabilidad de permanecer libre de recurrencias, luego de 6 meses después de una infección, fue 66% por microscopía, y de 62.6% por PCR. A su vez, el tiempo de detección se encontró asociado a factores como comunidad, edad, ocupación, número de episodios de malaria en su vida y tipo de mosquiteros utilizados. La DI de infecciones submicroscópicas que se vuelven microscópicas fue de 1.43 y de volverse indetectables fue de 22.81 por cada 100 personas-año. **Conclusión:** Se determinó el tiempo de detección y evolución de las infecciones submicroscópicas, y como el uso de solo microscopía no muestra el panorama completo sobre las recurrencias. Esta información es relevante para que el actual programa “Plan Malaria Cero” del Ministerio de Salud pueda diseñar mejores estrategias enfocando sus recursos en la búsqueda activa de infecciones submicroscópicas de malaria.

Palabras clave: Malaria, *Plasmodium vivax*, infección submicroscópica, recurrencia, evolución.

ABSTRACT

Introduction: In the Peruvian Amazon, *Plasmodium vivax* malaria transmission is maintained because 1) recurrences in this region are extremely common; contributing to the increase of submicroscopic cases and 2) these infections are not detected by the Ministry of Health, thus perpetuating the silent transmission cycle. In this context, understanding the duration and evolution of these recurrent submicroscopic infections would allow us to understand their impact on the persistence of malaria. **Methods:** We conducted a retrospective analysis of monthly clinical and epidemiological data from two communities in Loreto (Cahuide and Lupuna) from 2013 to 2015. Survival analysis was performed to determine the probability of remaining free of recurrences. Likewise, the association of factors with detection time was sought through Cox regression analysis. Finally, the incidence density (ID) of the evolution from submicroscopic infection to microscopic infection and undetectable infection was determined. **Results:** During the three years of follow-up, about 57% (195/343) of the individuals had at least one recurrence, of which 30.79% (93/195) had a recurrence in the first three months after microscopic infection. The probability of remaining free of recurrences 6 months after infection was 66% by microscopy and 62.6% by PCR. In turn, the time to detection was found to be associated with factors such as community, age, occupation, number of malaria episodes in their lifetime and type of nets used. The ID of submicroscopic infections becoming microscopic was 1.43 and of becoming undetectable was 22.81 per 100 person-years. **Conclusion:** We determined the time to detection and evolution of submicroscopic infections, and how the use of microscopy alone does not show the full picture of recurrences. This information is relevant so that the current "Zero Malaria Plan" program of the Ministry of Health can design better strategies focusing its resources on the active search for submicroscopic malaria infections.

Key words: Malaria, *Plasmodium vivax*, submicroscopic infection, recurrence, evolution.

CAPÍTULO I

INTRODUCCION

1.1 Antecedentes

1.1.1 Epidemiología de la Malaria: impacto en zonas endémicas

La erradicación de la malaria sigue siendo considerada como una prioridad para la salud pública mundial ya que afecta principalmente países pobres y en vías de desarrollo. Esta enfermedad potencialmente mortal es causada por parásitos del género *Plasmodium* y transmitida por mosquitos del género *Anopheles*. En el 2019, a nivel mundial, ocurrieron 229 millones de casos en 87 países endémicos. Se estima una tasa de incidencia anual de 57 casos por cada 1000 personas en riesgo, con un significativo declive del 29% desde el 2000 (1). A pesar de numerosos sistemas de vigilancia y programas nacionales de control y tratamiento, 409 000 infecciones resultaron en muerte, de las cuales el 67% ocurrieron en niños menores de 5 años (1). Países africanos como Nigeria, República Democrática del Congo, Uganda, entre otros, concentran el 95% de total de casos y muertes a nivel global. Por otro lado, en un escenario más alentador, los casos de malaria se redujeron en 40% y la tasa de mortalidad en 50% en el continente americano (1).

Las condiciones socio-demográficas, geográficas, ecológicas y hasta políticas han conllevado que cada región desarrolle métodos de intervención que se adecuen a su contexto; todo esto con el fin de mitigar la enfermedad (1–3). La prevención de la malaria es un problema importante, donde se han logrado grandes avances no solo en países con alta incidencia de la enfermedad, sino también en naciones donde las rutas hacia la eliminación se fortalecen. Factores como el comportamiento del vector, la transmisión espacio-temporal, y la dinámica de las infecciones pueden complicar este escenario; no obstante, el establecimiento de los programas nacionales de control mejora el panorama de la eliminación del parásito (2). Algunos de los elementos usados para la prevención son: distribución de mosquiteros tratados con insecticidas, fumigación de interiores, y quimio prevención estacional. Por ejemplo, en el 2019, países principalmente africanos recibieron hasta 253 millones de mosquiteros, donde es usado como principal método de control vectorial (1). A su vez, debido a la fumigación de los hogares, la población en riesgo disminuyó de 5.3% a 2.4% desde el 2010 (1).

La exploración de nuevas estrategias de control de malaria debe reforzar a las estrategias actuales, donde la vigilancia, el diagnóstico y tratamiento han sido priorizadas. La vigilancia pasiva de casos de malaria es ampliamente usada en muchas regiones; no obstante, en países con transmisión residual o en vías de eliminación, los casos se vuelven raros (3). Por ello, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda el uso de la vigilancia activa de casos, donde si bien el costo de intervenciones aumenta, este método permite detectar infecciones con características que dificultan su diagnóstico, como la ausencia de síntomas y la baja carga parasitaria (1). De este modo se identifican posibles puntos calientes o brotes de malaria. Asimismo, el aumento de casos no detectados por microscopía ha conllevado al desarrollo de métodos alternos, pero igual de efectivos, como las pruebas de LAMP (Loop mediated isothermal amplification, por sus siglas en inglés). Dentro de las estrategias para el tratamiento se encuentra la administración masiva de drogas antimaláricas (4). Este es un método usado en países con baja incidencia, y donde se busca la interrupción de la transmisión mediante el tratamiento de toda una población.

La efectiva vigilancia, detección y tratamiento de infecciones por malaria, con una gran cobertura en comunidades endémicas son estrategias para el control; sin embargo, estas deben ser focalizadas a grupos de riesgo. Se ha observado que adultos y hombres representan una importante proporción de casos, ligado a factores de comportamiento y ocupación (2). Este aumento se explica por el trabajo en plantaciones, actividades de caza y tala de árboles, en áreas donde el vector está presente. Así mismo las visitas nocturnas a bosques representan otro factor de riesgo ya que a estas horas el mosquito tiene mayor actividad. Otro grupo de riesgo son las mujeres embarazadas (2,3,5). En el 2019, 12 millones de mujeres presentaron una infección por malaria durante su embarazo, lo que ocasiono que 822 000 niños nazcan con bajo peso (1). Este grupo de riesgo es propenso a falla terapéutica, y además son vulnerables a infecciones que pueden concluir en abortos, anemia severa, hipoglicemia, entre otros (3,5).

En general, el último reporte de la OMS muestra una reducción considerable de casos en los últimos años, principalmente asociado al incremento de financiamiento, despliegue de sistemas efectivos de control, y mejoramiento de la vigilancia epidemiológica. Si bien la tasa de incidencia y mortalidad del continente americano no

se compara con los países africanos, la tasa de morbilidad genera un ambiente aún desafiante (6). Desde el 2013, 93% de la malaria en América se ha concentrado en Brasil, Colombia, Haití, Guyana, Perú y Venezuela. Asimismo, en estos últimos tres países hubo un incremento de la morbilidad. Nuevos mecanismos deben ser propuestos para acelerar el gran proceso hacia el objetivo de eliminar la malaria.

1.1.2 Malaria en la Amazonia Peruana: persistencia en la transmisión

Por muchas décadas, la prevalencia de malaria en el Perú ha sido influenciada por factores económicos, el inconstante apoyo para la eliminación de la enfermedad y la pérdida de medidas de control del vector y el parásito (7,8). Por ejemplo, en 1946 el uso de DDT mejoró el control del vector, disminuyendo los casos considerablemente y logrando que toda la costa, valles interandinos y el sur de la Amazonía estuviesen libres de malaria (8). Es así que en 1970, la resistencia de mosquitos al DDT y la disminución de fondos llevó nuevamente a un aumento de casos (8). Para 1990s el Perú aún no contaba con un control estructurado con lo cual la prevalencia de malaria aumentó 4 veces a nivel nacional y 50 veces en Loreto (8). Programas como “Control de la Malaria en Zonas Fronterizas de la Región Andina: Un Enfoque Comunitario” – PAMAFRO, a través de estrategias de diagnóstico, tratamiento temprano y detección activa, lograron en el 2011 la incidencia más baja de casos después de casi 40 años; sin embargo, a partir del 2012 hubo una rápida resurgencia debido a la finalización del proyecto (Fig. 1) (8,9).

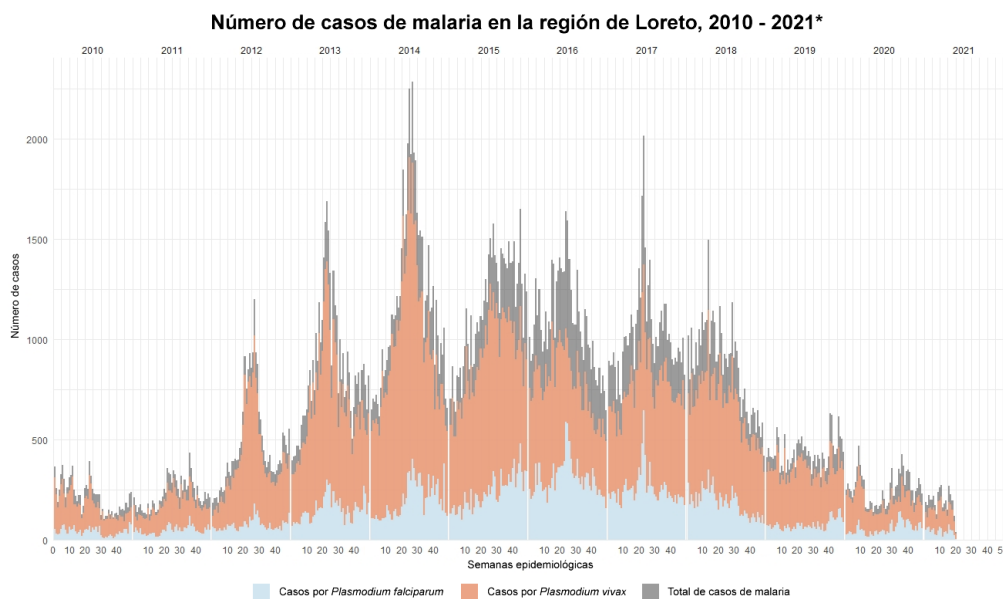


Figura 1. Número de casos de malaria en la región de Loreto desde el 2010 hasta el 2021. * La información del 2021 ha sido representada hasta la semana epidemiológica 20.

La región de Loreto concentra el mayor número de casos de malaria en el Perú. La Dirección General de Epidemiología reportó que el 82.03% de los casos de malaria por *Plasmodium vivax* detectados durante el 2020 ocurrieron en Loreto (10). Desde el 2014, se observa una reducción considerable de casos (Fig. 1), asociado al programa “Plan Malaria Cero”, que tiene por objetivo eliminar la malaria. No obstante, estas cifras están sesgadas por la forma de registro y monitoreo por parte del Ministerio de Salud. En el Perú, la vigilancia es pasiva, por cual pacientes asintomáticos, aquellos que no experimentan cuadros clínicos, y pacientes submicroscópicos, aquellos cuya parasitemia es solo detectable a través de métodos moleculares, pasarían desapercibidos y serían reservorios y posibles transmisores de la enfermedad (7). Asimismo, la transmisión de la malaria es heterogénea, con zonas de alta y baja transmisión, y donde más del 80% de casos se concentran solo entre 10 a 20% de comunidades (7). Factores como el clima húmedo y cálido, lluvias intensas, actividades económicas al aire libre (agricultura, la tala o la pesca), condiciones de vivienda más pobres, y hábitats idóneos para el desarrollo del vector han facilitado esta incidencia elevada (7,8).

Dos comunidades de la Amazonia Peruana, ampliamente estudiadas, han permitido conocer el comportamiento de la transmisión a lo largo del tiempo. Cahuide y Lupuna son dos grupos de comunidades ubicadas al noreste de Loreto, donde Cahuide se encuentra asociada a una zona de deforestación y alta migración; mientras que Lupuna es principalmente una zona de agricultura. Un estudio cohorte de 3 años, en ambas comunidades, reveló que la mayoría de las infecciones no eran detectadas por microscopía; además, sugiere que la presencia de estas infecciones submicroscópicas junto con las infecciones asintomáticas y de baja parasitemia son las que mantienen la transmisión de malaria, aún en temporada baja (11). Asimismo, se ha determinado que una gran proporción de estas infecciones presentaban la fase sexual del parásito, los gametocitos (12). Por ello, la persistencia de infecciones submicroscópicas y asintomáticas con presencia frecuente de gametocitos podrían ser los factores que mantienen la transmisión de malaria en las comunidades.

Actualmente, la vigilancia a través de la epidemiológica tradicional no muestra el panorama completo de la transmisión; por lo que, en regiones con malaria residual como la nuestra, enfoques moleculares y tecnológicos son necesarios. De hecho, a través de genética de poblaciones, se ha comprobado que existe una alta diversidad

parasitaria y una clara diferenciación genética entre parásitos de distintas comunidades, donde el mantenimiento de la transmisión se asocia a la movilidad humana (13–15). Por lo que, se debe implementar nuevos dispositivos e instrumentos para la trazabilidad de la población móvil y determinar su asociación con la dinámica de malaria (16,17).

1.1.3 Biología de *Plasmodium vivax*: ciclo de vida y tratamiento

Su complejo ciclo de vida involucra la transmisión del parásito a través de la picadura del mosquito vector del género *Anopheles*, y al humano como hospedero definitivo. El ciclo inicia cuando el mosquito hembra pica a una persona infectada para ingerir sangre para el desarrollo de sus huevos y con ella absorbe los gametocitos del parásito. Dentro de su estómago se llevará a cabo el ciclo sexual donde la fecundación del gameto femenino y masculino formará el cigoto, la forma diploide del parásito. Este cigoto se transformará a ooquinetos (forma alargada con movimiento) y atravesará las células del estómago adhiriéndose a la cara externa, convirtiéndose en ooquiste. El ooquiste producirá esporozoítos (estadio haploide), que se dispersarán llegando a las glándulas salivales. Los esporozoítos son inyectados dentro de la piel a través de una picadura. Estos abandonarán el sistema vascular y linfático, llegando a las células del hígado, donde se multiplicarán y madurarán hasta formar esquizontes, los cuales al romperse liberan los merozoítos maduros (fase exo-eritrocitaria). Cuando el merozoito llega al torrente sanguíneo invagina a los eritrocitos en donde el parásito evoluciona en forma de trofozoíto y esquizonte. La ruptura del glóbulo rojo infectado libera merozoítos para infectar nuevos glóbulos rojos (fase eritrocitaria). Algunos merozoítos no van a multiplicarse asexualmente y evolucionan en las formas sexuales como gametocitos. En el ciclo de *P. vivax* se observa que algunos esporozoítos pasan por una fase de espera o latencia en el hígado, denominado hipnozoítos, el cual puede permanecer meses o años antes de empezar la división celular (Fig. 2) (18–21).

P. vivax, a diferencia de otras especies, presenta ciertas características que dificultan su control y eliminación. En primer lugar, la presencia de una fase de latencia puede causar episodios de recaídas a pesar de recibir tratamiento. Además, produce fiebre a pesar de niveles bajos parasitemia debido a su preferencia por invadir reticulocitos (20). Dentro del ciclo de *P. vivax* existe también un desarrollo temprano y continuo de gametocitos, apareciendo antes de los síntomas clínicos por lo que la transmisión puede darse antes del diagnóstico (20,22). Por último, una de las razones

que le permite mantenerse en circulación en su habilidad de aumentar la plasticidad de los eritrocitos, a diferencia de la rigidez de *P. falciparum*, por lo que puede pasar a través de las cuerdas esplénicas y evitar ser removidos (22).

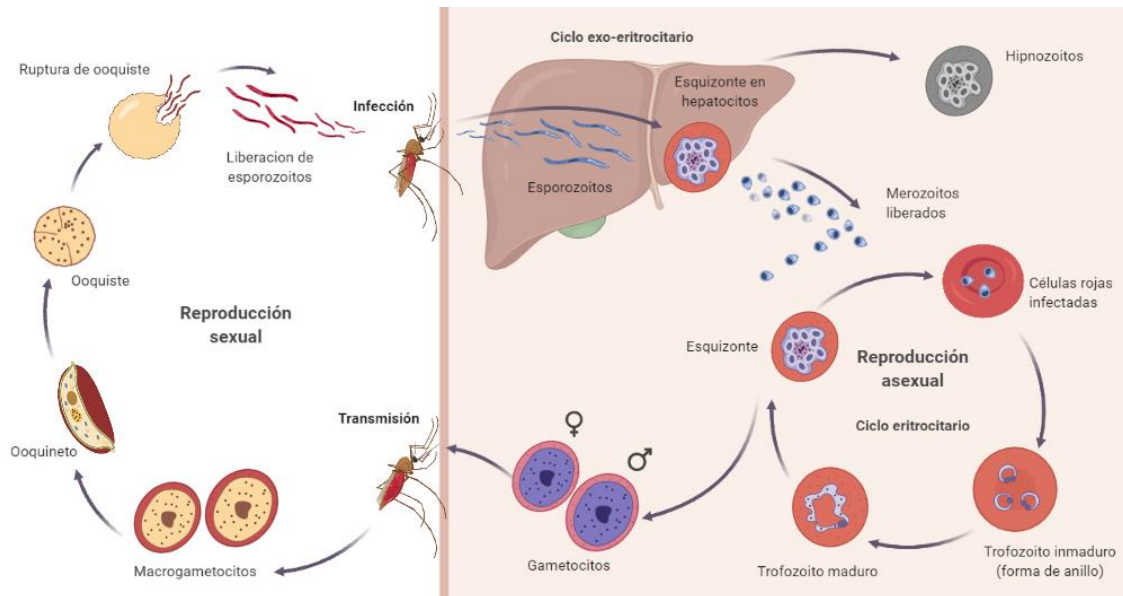


Figura 2. Ciclo biológico de *Plasmodium vivax* en el vector y el hospedero. Hecho en Biorender.com

La OMS recomienda el tratamiento con cura radical para controlar infecciones por *P. vivax*, el cual consta de cloroquina y primaquina (23). La cloroquina, por más de 50 años, ha sido la principal droga para tratar malaria por *P. vivax* debido a su potencial para eliminar fases hemáticas asexuales (24). Se recomienda una dosis de 25 mg/kg por 3 días (8,23,24). Si bien las concentraciones plasmáticas de cloroquina se mantienen por encima de la concentración de inhibición mínima durante 28 días para eliminar a la fase hemática del parásito (24); no tiene la capacidad de eliminar la fase latente de hipnozoitos (23,24). Por lo que el uso de primaquina es esencial para eliminar las fases hepáticas. La dosis recomendada por la OMS es de 0.25-0.50 mg/kg por 14 días (23); sin embargo, el Programa Nacional de Control de la Malaria del Perú cambió el régimen a 7 días aumentando la dosis debido a falta de adherencia al tratamiento (8). A pesar de ello, en Iquitos, capital de Loreto, se ha reportado que solo el 62,2% de pacientes completan el tratamiento de cura radical. Las creencias locales y percepción de los efectos adversos son las causas principales de estos problemas de adherencia (25). Además, el uso de primaquina puede llegar a altamente tóxico en personas con deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa causando hemólisis (5,20,23,24); no obstante, la prevalencia de esta deficiencia en la población peruana es muy baja, por lo que aún no se establecen pruebas pre tratamiento.

1.1.4 Infecciones submicroscópicas: retos en el diagnóstico

Un reto, ya previamente expuesto, es la identificación de infecciones que a través de un diagnóstico por microscopía o pruebas estándar de diagnóstico rápido (RDT) no son posibles de detectar. Este tipo de infecciones son conocidas como submicroscópicas o subpatentes, y su aumento en la proporción general de infecciones a nivel mundial, ha conllevado a ser considerado un gran obstáculo en la eliminación de la enfermedad en países con baja y alta transmisión (7,26–28). La detección pasiva de casos usa métodos de diagnóstico de rutina, como microscopía y RDTs, que ya no son lo suficientemente sensibles para detectar niveles de parasitemia tan bajos (< 100 parásitos/uL) o pacientes que no experimentan síntomas clínicos (asintomáticos) (7,26,28). Por lo que el uso de pruebas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), que detecta y caracteriza la parasitemia de manera más precisa, son necesarios para el bloqueo de la transmisión persistente (27).

Muchos estudios han comparado el uso de PCR con microscopía para caracterizar las infecciones submicroscópicas (29–36). Una revisión sistemática, donde se incluyó 40 encuestas transversales y revisó más de 850 estudios desde 1996, determinó que PCR fue el método más efectivo para detectar infecciones submicroscópicas (37). Además, se determinó que la prevalencia por microscopía fue 67% menor que la prevalencia detectada por PCR (37). Por ejemplo, en el sureste de Zambia, se determinó que de una prevalencia del 2.6% (102/3,863) de malaria, cerca del 50% de las infecciones no fueron detectadas por microscopía (33). De igual manera, en el distrito de Jazan en Arabia Saudita, que presenta una baja transmisión, se detectó 26,6% de infecciones asintomáticas y 23,3% de infecciones submicroscópicas (34). En la Amazonia, específicamente en Brasil, en asentamientos de ganadería, se observó un incremento de la proporción de submicroscópica de 43.8% en 2010 a 73.1% en 2013 (35). En Perú, se ha reportado prevalencias altas de infecciones no detectadas por microscopía, donde la relación infección submicroscópica/microscópica llegó hasta casi 4 a 1 (12,15,36,38).

Se ha comprobado que la PCR y sus variantes son más eficientes frente a la microscopía en muchos países con diferentes contextos epidemiológicos (39–43). Sin embargo, en países con bajos recursos y poco acceso a esta tecnología, es aún complicado utilizar esta técnica molecular de manera rutinaria (28). Asimismo, la difícil entrada a

comunidades endémicas a malaria, los altos costos de procesamiento de muestras, y muchas veces el poco apoyo gubernamental, no aportan a la oportunidad de implementar este diagnóstico (7,28). Por consiguiente, el uso de alternativas al PCR como LAMP es crucial para resolver el problema de accesibilidad. Muchos países endémicos han probado su gran potencial y eficiencia para el diagnóstico de malaria. En Perú, las pruebas de LAMP han probado una sensibilidad de casi 90% y una especificidad de hasta 95%, con una gran similitud a PCR (44,45). Asimismo, se estima que su límite de detección puede ser entre 2.4 a 3.7 parásitos/uL (45), lo que permitiría la detección de infecciones con baja parasitemia. Poder determinar los potenciales reservorios de pacientes con infecciones submicroscópicas de malaria y seguir desarrollando métodos de PCR ultrasensibles y accesibles deben mantenerse como objetivos esenciales para la eliminación de la enfermedad (26,28).

1.1.5 Recurrencia de infecciones: biología del relapso, recrudescencia y reinfección.

Una recurrencia, o también llamada recaída, se define como la reaparición de parásitos asexuales luego de culminado el tratamiento (46). En los últimos años en la Amazonía, algunos estudios han reportado la ocurrencia de infecciones luego del tratamiento con cura radical. Uno de ellos realizó el seguimiento por un año a pacientes infectados por *P. vivax*, siguiendo las pautas nacionales para el tratamiento (25 mg/kg de CQ por 3 días, 0.50 mg/kg de PQ por 7 días). De los 51 pacientes tratados, el 57% experimentó una recaída, y 16 de ellos presentaron más de un episodio (47). El segundo evaluó la eficacia del tratamiento de cura radical versus el tratamiento de diferentes concentraciones de tafenoquina. El seguimiento de 6 meses a los 47 pacientes que fueron tratados con primaquina y cloroquina (25 mg/kg de CQ por 3 días, 0.15 mg/kg de PQ por 14 días) reportó un 22.7% de recurrencias de infección (48). El tercer estudio evaluó la eficacia de 3 regímenes de primaquina (0.5 mg/kg por 5 días, 0.5 mg/kg por 7 días y 0.25 mg/kg por 14 días). De los 162 pacientes que recibieron el tratamiento actualmente utilizado (0.5 mg/kg por 7 días), se observó un 10.3% de recurrencia. Además, no observaron diferencias significativas con el tratamiento recomendado por la OMS (0.25 mg/kg por 14 días, 13,6% de recurrencia) por lo que concluyen que el tratamiento usado por el Ministerio de Salud es igual de eficaz (49). El cuarto estudio realizó seguimiento por 6 meses a pacientes tratados con primaquina (15mg/kg por 14 días) y tafenoquina (una dosis de 300 mg) con el fin de evaluar su eficacia. De los 214

pacientes tratados con cura radical, 27.2% experimentaron recurrencia con respecto al 33% del tratamiento de tafenoquina (426 pacientes), concluyendo así que ambos tratamientos son igualmente efectivos para la eliminación de fases asexuales (50). Todos los estudios muestran tasas alarmantes de recurrencias; sin embargo, se debe tomar en cuenta el tiempo de seguimiento, la dosis de los tratamientos y el contexto epidemiológico de transmisión, por lo que estos datos reflejan la heterogeneidad de la aparición de recurrencias.

Existen 3 posibles causas de las recurrencias: relapso, recrudescencia y reinfección (Fig. 3) (46). Los relapsos se definen como la activación de la fase latente de hipnozoitos. Los intervalos de activación de los relapsos son variantes: en el caso de las cepas temperadas, el intervalo entre relapsos es de aproximadamente 9 meses; y las tropicales, el intervalo es de 3 semanas (46,51). Aún se desconoce el mecanismo de activación; sin embargo, infecciones sistemáticas por parásitos o bacterias pueden activar a los hipnozoitos (46,52). Se ha determinado que grandes inoculaciones de esporozoítos y la ausencia de tratamiento con cura radical aumentan la probabilidad de los relapsos (51). Existe además la presencia de relapsos homólogos (genotipo de la primera infección igual al genotipo de la recurrencia) y heterólogos (genotipo de la primera infección diferente al genotipo de la recurrencia). La segunda causa es la recrudescencia, que se define como la reaparición de fases hemáticas asexuales en la sangre (52). Estas, igualmente que un relapso homólogo, el genotipo será igual en la primera infección y en la recurrencia; no obstante, se diferencian en su tiempo de aparición. Un tratamiento eficaz de cura radical, en teoría, tiene un tiempo de acción de 28 días por lo que una recurrencia en ese periodo se debería por una recrudescencia. Luego de ese tiempo de acción, se caracterizarían como relapsos. La última causa es la reinfección, que se refiere a la presencia de estadios parasitarios en la sangre debido a la picadura de un nuevo mosquito (52). Al ser una nueva inoculación después del tratamiento, el genotipo de la recurrencia sería diferente, al igual que un relapso heterólogo, por lo cual la diferenciación entre estas dos causas es aún complicada. Un estudio realizó seguimiento por 2 años a 302 pacientes infectados por *P. vivax* en 25 comunidades de Loreto para determinar el origen de su recurrencia (53). Dentro de los primeros 28 días de seguimiento, no se observaron recrudescencias, pero la tasa de reinfecciones fue de 3.7%. Pasado del día 28, dentro de las recurrencias homólogas se observó un 4% de relapsos y 5% de reinfecciones. Por otro lado, dentro de las recurrencias heterólogas se encontró un 11.3% de relapsos y un 3.6% de reinfecciones.

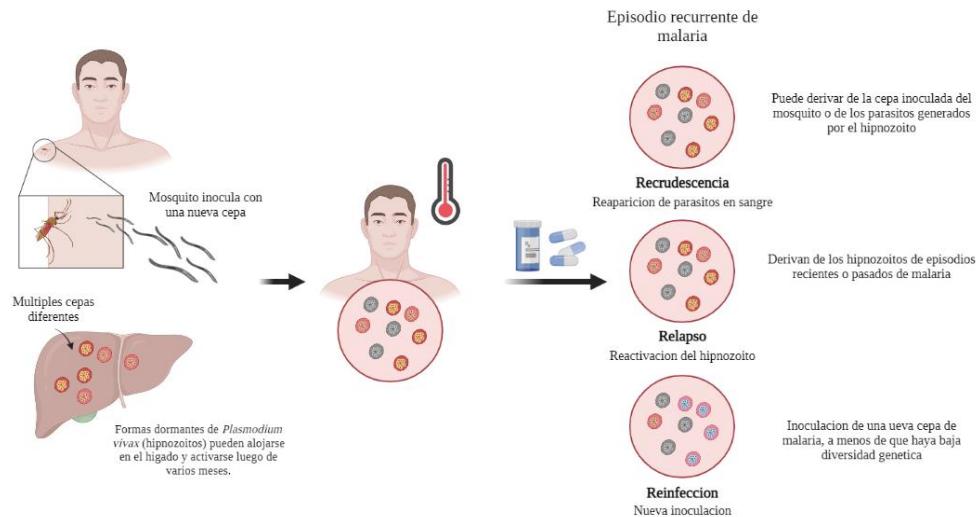


Figura 3. Dinámica de los tipos de infecciones recurrentes por *Plasmodium vivax*. El diagrama muestra una infección inicial por una sola especie de parásito en un paciente con hipnozoitos preexistentes. La infección inicial puede implicar múltiples cepas que circulan en la sangre, por lo que la diferenciación de cepas en las infecciones recurrentes es aún complicada. Hecho en Biorender.com, adaptado de: www.vivaxmalaria.org.

Factores como falta de adherencia al tratamiento, metabolismo rápido de las drogas y resistencia parasitaria pueden aumentar la probabilidad de una recurrencia de infección. En Perú se ha reportado baja adherencia al tratamiento de 7 días (25), por lo que estudios clínicos evaluando la eficacia de nuevas drogas como tafenoquina son importantes para implementar drogas de una sola dosis (48,50). Por otro lado, el metabolismo de primaquina y cloroquina es mediada por el citocromo P450 en las isoformas CYP2D6/ CYP2C8 para la transformación de la droga en metabolitos activos (54). Se ha demostrado que mutaciones en regiones que codifican estas proteínas alteran el metabolismo y aumentan la probabilidad de un relapso (54). En un estudio, donde se incluyó un grupo de pacientes peruanos, determinó que los individuos con metabolismo intermedio aumentan la tasa de relapsos en comparación de individuos con metabolismo normal (55). Por último, la resistencia a cloroquina se define como una reaparición de estadios asexuales hemáticos dentro de los 28 días de una dosis de tratamiento en presencia de un nivel de cloroquina medido en sangre entera ($> 100 \text{ ng / mL}$) o plasma ($> 10 \text{ ng / mL}$) (56). Se ha reportado este fenómeno desde 1989 en diferentes países de Asia (56), y en Perú no existen datos concluyentes para asegurar una resistencia parasitaria a la droga (7). Muchos de estos estudios no tomaron en cuenta la adherencia al tratamiento y el metabolismo de la droga, además la falta de una

técnica de cultivo *in vitro* viable, o la caracterización de genes de resistencia, dificultan la interpretación de los resultados.

1.1.6 Tiempo de detección de infecciones: dinámica y evolución.

Los estudios sobre la dinámica natural del parásito causante de malaria existen debido a su antiguo uso para el tratamiento de la sífilis (57–59). En 1999, en un estudio retrospectivo de 97 pacientes con sífilis, se describió que las personas, previamente infectadas por *P. vivax* (con duración de infecciones en promedio de 176.4 días), al ser inoculados por *P. falciparum* podían presentar infecciones de hasta 100 días (60). Asimismo, durante el tratamiento con malaria para 343 pacientes con neuro sífilis se determinó que 123 pacientes, inoculados con esporozoitos y trofozoítos y que no recibieron tratamiento, tuvieron episodios de recrudescencia de hasta 108 días (61). En estudios sobre episodios de malaria en países no endémicos, con antecedentes de viajes, y transfusiones accidentales de sangre se describe que las infecciones podrían llegar a durar hasta 13 años (62). Estos reportes representan un aporte al conocimiento básico sobre la duración de las infecciones naturales del parásito. Esto implicaría que las personas infectadas, y no tratadas, constituirían el reservorio del parásito y por ende contribuirían a su transmisión.

Ahora, a través de métodos moleculares más sensibles, los estudios longitudinales con riguroso seguimiento permiten estudiar la dinámica de infección por malaria luego del tratamiento. En Oceanía y Asia, países hiper endémicos, un estudio estimó que la duración de las fases eritrocíticas de *P. falciparum* se mantienen por 36 y 135 días, en Nueva Guinea y Tailandia respectivamente (52). En el caso de *P. vivax*, por presentar la fase de hipnozoitos y poder generar relapsos, la estimación precisa no fue posible (52). Sin embargo, creen que la presencia de la forma asexual de parásitos puede mantenerse desde 24 hasta 29 días luego del tratamiento (52). Asimismo, la fase latente puede establecerse desde 226 hasta 383 días en el hígado, pudiendo generar relapsos durante este periodo y posiblemente aumentando la transmisión (52). En Ghana, a través de un estudio cohorte de un año, se estimó una duración de infección, para *P. falciparum*, en promedio de 168 días (63). Encontraron que el grupo etario de 5 a 9 años presentaba una mayor duración de infección.

Un factor importante asociado al tiempo de la infección es la frecuencia de las recurrencias. Por ejemplo, en la provincia de Quang Nam, en Vietnam, luego del

tratamiento de cura radical (primaquina y cloroquina) y seguimiento mensual, se detectó que el 76,78% de pacientes (n=223) tuvieron infecciones recurrentes de *P. vivax* identificados por métodos moleculares, dentro los cuales 62,33% de ellos eran asintomáticos (64). Además, encontraron que el tiempo promedio de recurrencia fue de 118 días. Otro estudio en dos comunidades de Vietnam, durante el seguimiento de dos años de 356 pacientes luego de una administración masiva de drogas, se determinó una duración de 2 meses para las infecciones por *P. falciparum*, mientras que 4 meses para infecciones por *P. vivax* (65). Pudieron determinar también que los participantes tenían entre 20 – 59% de probabilidad de mantener la parasitemia por 4 meses o más. Asimismo, en Camboya, el seguimiento de un año de una cohorte de 136 personas determinó que los individuos infectados inicialmente con *P. falciparum* podían mantener su parasitemia de 2 a 4 meses. Por otro lado, los individuos infectados inicialmente con *P. vivax* se mantenían infectados por cuatro meses o más (66).

1.2 Planteamiento del Problema

La malaria por *Plasmodium vivax* es una enfermedad parasitaria ampliamente distribuida, afectando cerca del 40% de la población. El esfuerzo de Perú para eliminar la enfermedad se ha visto afectado por la falta de apoyo económico, el difícil acceso al sistema de salud, la presencia de infecciones submicroscópicas y la existencia de una fase latente del parásito. *P. vivax*, a diferencia de otras especies, posee una fase latente hepática en forma de hipnozoítos que le permite activarse meses o años después y generar nuevas infecciones. La OMS recomienda el tratamiento llamado cura radical, el cual consta de cloroquina y primaquina; sin embargo, en el Perú se han reportado altas tasas de recurrencia luego de este tratamiento. Las continuas recurrencias resultan en un tiempo inadecuado para recuperarse del daño hemático llevando a anemia severa, además estas personas podrían mantenerse como potenciales reservorios del parásito. Aún no se conoce completamente las características de las recurrencias durante periodos de seguimiento largos, especialmente de las infecciones submicroscópicas, que no son detectadas ni tratadas por el Programa Nacional de Malaria. La heterogeneidad de la prevalencia de la malaria en el Perú recae también en las características sociodemográficas y ecológicas, a pesar de esto aún se explora la asociación de factores epidemiológicos con el tiempo de detección de las recurrencias. Asimismo, la determinación de un patrón de evolución de infecciones submicroscópicas a infecciones microscópicas, y a infecciones indetectables es un área poco estudiada. Por lo que estudiar la dinámica de las recurrencias, especialmente de las no detectadas por microscopía, nos permitiría enfocar los recursos y entender el comportamiento de la enfermedad en comunidades de la Amazonia Peruana.

1.3 Justificación del estudio

La incidencia de la malaria en el Perú ha disminuido en los últimos años, no obstante, la prevalencia de las infecciones submicroscópicas es aún preocupante. Este estudio busca entender el comportamiento de estas infecciones a través de su caracterización. Las infecciones submicroscópicas no son detectadas por la vigilancia convencional, pero son capaces de mantener la transmisión, perpetuando el ciclo de transmisión silente. Conociendo el tiempo de detección de recurrencias, duración y otras características como la evolución y los factores asociados ayudaran a comprender mejor su impacto en la perpetuación de malaria en ciertas zonas. A su vez, la cohorte del proyecto "Impacto de los portadores asintomáticos en la Epidemiología en control de la malaria en la Amazonía peruana" presenta información valiosa y relevante durante tres años de seguimiento a individuos de comunidades de Loreto que permitirá entender el mecanismo de la transmisión de la enfermedad. Poder determinar el patrón temporal de las infecciones recurrentes, especialmente las no detectadas por Programa Nacional de Malaria del MINSA, sería un factor importante por conocer en la epidemiología de la malaria. En este sentido, la información obtenida de este trabajo contribuirá a una mejor focalización de recursos para eliminar la enfermedad en la Amazonia Peruana.

CAPÍTULO II

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Pregunta de investigación

¿Cuál es la evolución parasitológica y clínica de las infecciones recurrentes submicroscópicas de *Plasmodium vivax* en dos comunidades de la Amazonía Peruana durante un estudio cohorte de 3 años?

2.2 Hipótesis

- Las infecciones recurrentes por *P. vivax* son frecuentes, con una alta proporción de ellas no detectables por microscopía.
- Las infecciones recurrentes por *P. vivax* no detectables por microscopía evolucionan con mayor frecuencia a infecciones indetectables que a infecciones microscópicas.

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivos Generales

- Determinar la evolución parasitológica y clínica de las infecciones recurrentes submicroscópicas por *P. vivax*.

2.3.2 Objetivos Específicos

- Estimar el tiempo de detección de las infecciones recurrentes luego de una infección microscópica inicial.

- Determinar que factores están asociados al tiempo de detección de una infección recurrente luego de una infección microscópica inicial.
- Determinar la densidad de incidencia de que una infección submicroscópica evolucione en una infección microscópica.
- Estimar el tiempo para la evolución de una infección submicroscópica a una infección microscópica.
- Determinar la densidad de incidencia de que una infección submicroscópica se vuelva indetectable.
- Estimar el tiempo para la evolución de una infección submicroscópica a una infección indetectable.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Área de estudio

El estudio fue realizado en Cahuide y Lupuna, ubicadas al noreste de la región de Loreto. Cahuide ($04^{\circ}13'785''S$, $73^{\circ}276''W$) se localiza en ambos lados de la carretera Iquitos-Nauta y está formado por tres comunidades: La Habana, Doce de Abril, y Cahuide. Lupuna ($03^{\circ}44'591''S$, $73^{\circ}19'615''W$) se localiza en el distrito de Iquitos, y donde su único acceso es a través del río Nanay. Comprende, asimismo, a tres comunidades: Santa Rita, San José de Lupuna y San Pedro. Las principales actividades económicas de ambas comunidades son agrícolas.

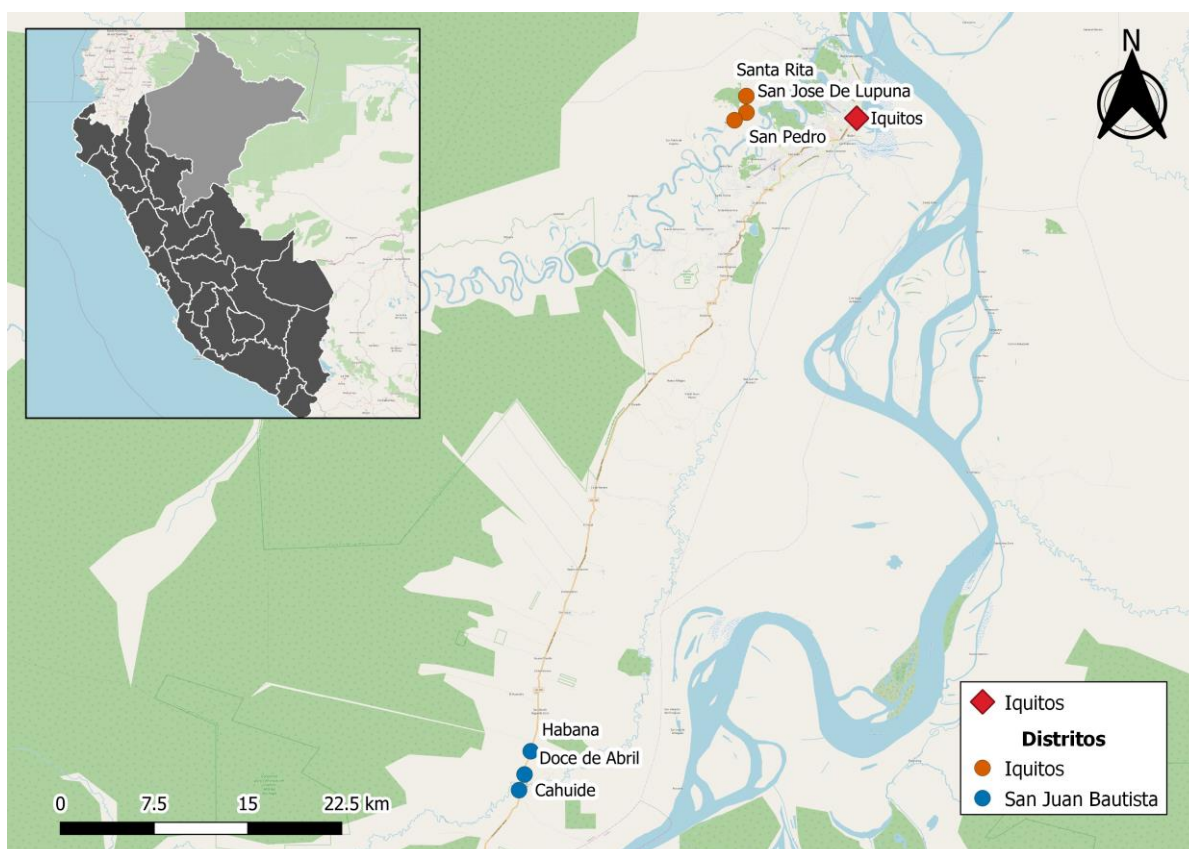


Figura 4. Mapa de las áreas de estudio. Sitios: Lupuna, que incluye Santa Rita, San José de Lupuna y San Pedro, mientras que Cahuide incluye Habana, Doce de Abril y el pueblo de Cahuide.

3.2 Diseño de estudio

Se realizó un análisis secundario al estudio prospectivo de cohorte longitudinal realizado por el proyecto "Impacto de los portadores asintomáticos en la Epidemiología en control de la malaria en la Amazonía peruana", desde enero del 2013 hasta diciembre de 2015 (código SIDISI: 57395). Dentro del protocolo del estudio, los residentes mayores de 3 años de edad de las comunidades de Cahuide y Lupuna fueron invitados a participar y firmar el consentimiento o asentimiento informado. Los seguimientos mensuales para toda la cohorte se realizaron mediante búsqueda activa de casos (barrido mensual y detección semanal) y detección pasiva de casos. Todos los pacientes respondieron una encuesta sobre datos clínicos y sociodemográficos. Asimismo, se colectó una muestra de sangre a través de punción digital en una lámina para el diagnóstico por microscopía y en papel filtro (Whatman grado 3, 340 Whatman, Springfield Mill, USA) para el diagnóstico molecular mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Durante la búsqueda activa, los individuos positivos a *Plasmodium* por microscopía era referidos al puesto de salud más cercano para su tratamiento; mientras que, durante la detección pasiva, los individuos eran tratados en el puesto de salud inmediatamente. El esquema de tratamiento para malaria, de acuerdo con guías del Ministerio de Salud, fue cloroquina por tres días (10 mg/g para días 1 y 2, y 5 mg/kg para día 3) y primaquina por 7 días (0.5 mg/kg/día) para infecciones por *P. vivax*; mientras que mefloquina por 2 días (12.5 mg/kg/día) y artesunato por 3 días (4 mg/kg/día) para infecciones por *P. falciparum*.

El diagnóstico por microscopía se realizó por gota gruesa, donde las láminas fueron teñidas con solución al 10% de Giemsa. Se le consideró como negativo si no se encontraba presencia del parásito luego de examinar 100 campos microscópicos. De las muestras de sangre impregnadas en papel filtro se extrajo ADN (ácido desoxirribonucleico) usando un kit comercial (QIAamp DNA Blood Minikit, Qiagen, Hilden, Germany). El diagnóstico molecular se basó en la detección del gen 18s rRNA de *Plasmodium* por PCR descrita por Mangold (Mangold *et al.*, 2005).

3.3 Análisis estadísticos

El análisis estadístico de los datos fue realizado empleando el programa estadístico R (versión 4.0.0) en la plataforma de RStudio (versión 1.2.5042), usando los paquetes: "rstatix", "stats," "survival", y "survminer". El proyecto base presentaba

información de 696 individuos con diagnóstico mensual por microscopía y PCR. Sin embargo, este estudio incluyó a 343 individuos, aquellos que cumplieron el siguiente criterio: (1) individuos con una infección microscópica confirmada por *P. vivax* durante el periodo de la cohorte, (2) individuos con PCR y microscopía negativas en el mes o meses siguientes (21-45 días), y (3) microscopía y PCR mensuales disponibles, desde la infección microscópica por *P. vivax*. De acuerdo a este criterio, se usará esta infección microscópica inicial como punto de partida o punto de limpieza parasitológica, ya que el paciente recibió tratamiento. Se definió una infección microscópica como los pacientes positivos por microscopía, mientras que una infección submicroscópica se definió como un paciente negativo a microscopía, pero positivo por PCR. Las características sociodemográficas, epidemiológicas y de los hogares fueron representadas en tablas, donde se usó la prueba exacta de Fisher para comparar las proporciones entre comunidades.

El análisis de supervivencia (Kaplan-Meier) para determinar la probabilidad de permanecer libre de recurrencias se realizó frente a 2 posibles resultados: (1) El tiempo desde la detección de la infección microscópica hasta la siguiente recurrencia detectada por microscopía, y (2) el tiempo desde la detección de la infección microscópica hasta la siguiente recurrencia detectada por PCR. Para los dos posibles resultados se tomará el tiempo desde el punto de inicio, la infección microscópica, ya que, según el protocolo, al haber recibido tratamiento, el individuo se encuentra libre de infección por malaria. Debido a la naturaleza de la prueba es posible presentar un tipo de problema conocido como censura, es decir, datos perdidos. Esto ocurre cuando, durante el seguimiento, el evento nunca se produce o cuando el sujeto abandona el estudio. Considerando esto, se hará una censura de derecha, debido a que el tiempo de supervivencia real de la persona se vuelve incompleto antes del periodo de seguimiento. Esto se produce cuando el estudio termina o cuando la persona se pierde el seguimiento o se retira. De la misma manera, los análisis de supervivencia se realizaron tomando en cuenta la comunidad de residencia, sexo, grupo etario, ocupación, y número de episodios previos de malaria.

A través de análisis univariados de regresión de Riesgo Proporcional de Cox se halló el cociente de riesgo que permitió determinar la asociación de características socio-demográficas como edad, sexo, variables de movilidad, condiciones de hogar, trabajo, entre otras, con el tiempo de infección de los 2 posibles resultados. Aquellas variables que obtuvieron un valor de p menor a 0.2 fueron incluidas en el análisis multivariado, la cual fue ajustada por factores de desviación (confounder). Se verificó el

supuesto de riesgos proporcionales, por lo que el análisis multivariado tuvo que estratificarse por comunidad.

El análisis de la evolución de las infecciones submicroscópicas se realizó frente a dos posibles escenarios: Luego de una infección microscópica tratada, (i) la infección submicroscópica subsecuente evolucionará a una infección microscópica, o (ii) la infección submicroscópica evolucionará a una infección indetectable (Fig. 5). Una submicroscópica pasó a ser indetectable, cuando el resultado del diagnóstico por microscopía y/o PCR fue negativo (ausencia real del parásito o no fue detectado por el método de diagnóstico utilizado), por lo que para este estudio se le denominará infección indetectable. Se determinó la densidad o tasa de incidencia a través del cociente de número de nuevo casos (dos escenarios) y el número total de personas – año en riesgo. El valor de personas – año se calculó con la suma de todos los meses de seguimiento por 3 años del N muestral y se dividió en 12 meses, que corresponde a un año. Asimismo, se realizó el análisis de supervivencia para determinar tiempo desde la detección de la infección submicroscópica hasta el mes que la infección se vuelva microscópica, y el tiempo desde la detección de la infección submicroscópica hasta el mes que se volvió indetectable.

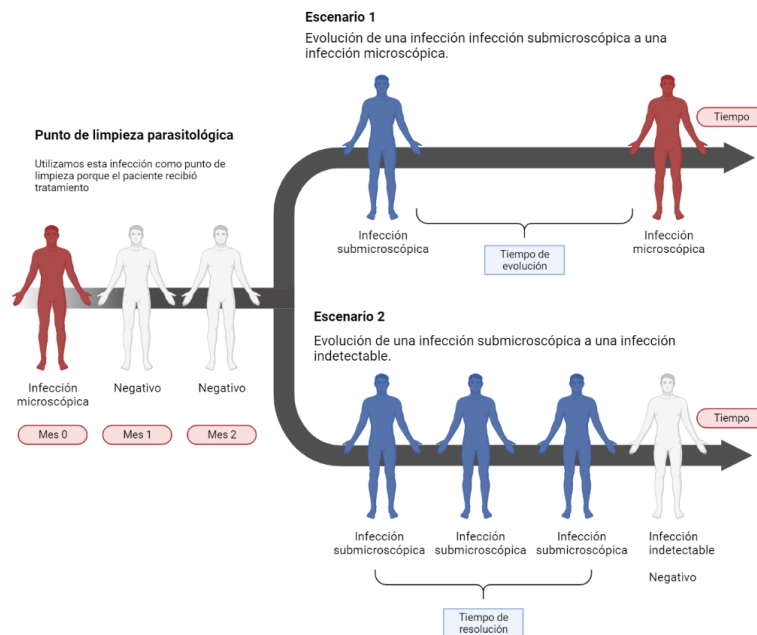


Figura 5. Diagrama de los escenarios estudiados sobre la evolución de las infecciones submicroscópicas. Hecho en Biorender.com

3.4 Consideraciones éticas

El presente estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia bajo el código SIDISI 204648.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1 Características sociodemográficas de la población estudio.

Las características sociodemográficas incluyeron 343 individuos distribuidos en 182 hogares provenientes de las comunidades de Cahuide y Lupuna (Tabla 1). De esta población, 123 (35.86%) vivían en Cahuide, y 220 (64.14%) en Lupuna. La proporción de hombres (56.85%) y mujeres (43.15%) en las comunidades fue casi semejante, sin diferencias significativas entre sitios (p -valor = 1.0000). Asimismo, la proporción, general y dentro de las comunidades, de las edades de los participantes ≤ 15 años (46.65%) y > 15 años (53.35%) fue similar (p -valor = 0.4313). Con respecto a la educación, 55.98% de la población reportó haber culminado estudios primarios, seguido por estudios secundarios con 29.15%. Solo el 19.53% de los participantes trabaja en una ocupación al aire libre como leñador, pescador o agricultor, sin diferencias significativas entre sitios (p -valor = 0.2009). Al evaluar la migración midiendo el tiempo de residencia en la comunidad se encontró que 49.85% de los individuos reside en su comunidad por más de 10 años. Sin embargo, esta proporción fue mayor en Lupuna (58.18%) que en Cahuide (34.96%) (p -valor < 0.0001). De igual manera, se midió el grado de la movilidad humana de acuerdo a si el participante viajó en el último mes a más de 10 km. de su comunidad. Sorprendentemente solo el 1.17% ($n = 4$) reportó haber hecho un viaje fuera de su comunidad. Además, los participantes que reportaron haber presentado al menos un episodio de malaria por *Plasmodium vivax* en toda su vida fue más común en Lupuna (70.01%) que en Cahuide (66.67%) (p -valor = 0.0023). No obstante, 70.55% de ellos reporta que no tuvieron infección en el último año. Al considerar infecciones recientes, 53.67% de los individuos de Cahuide si presentó malaria en el último año, mientras que en Lupuna solo el 15.91% (p -valor < 0.0001).

Tabla 1. Características sociodemográficas y epidemiológicas de los participantes del estudio en las comunidades de Cahuide y Lupuna ($n = 343$)

	Total		Cahuide		Lupuna		p -valor
	n	%	n	%	n	%	
Sexo							
Mujer	195	56.85	70	56.91	125	56.82	1.0000
Hombre	148	43.15	53	43.09	95	43.18	

Edad							
≤ 15 años	160	46.65	61	49.59	99	45.00	0.4313
> 15 años	183	53.35	62	50.41	121	55.00	
Educación							
Ninguno o escuela inicial	49	14.29	18	14.63	31	14.09	0.0852
Escuela primaria	192	55.98	78	63.41	114	51.82	
Escuela secundaria	100	29.15	27	21.95	73	33.18	
Educación universitaria o superior	2	0.58	0	0.00	2	0.91	
Ocupación al aire libre (leñador, pescador o agricultor)							
Si	67	19.53	19	15.45	48	21.82	0.2009
No	276	80.47	104	84.55	172	78.18	
Tiempo en la comunidad *							
<2 años	39	11.37	27	21.95	12	5.45	< 0.0001
2 - 10 años	133	38.78	53	43.09	80	36.36	
>10 años	171	49.85	43	34.96	128	58.18	
Viaje en el último mes a más de 10 km. de la comunidad *							
Si	4	1.17	4	3.25	0	0.00	0.0160
No	339	98.83	119	96.75	220	100.00	
Episodios de malaria por <i>Plasmodium vivax</i> en su vida *							
0	107	31.20	41	33.33	66	30.00	0.0023
1	79	23.03	38	30.89	41	18.64	
2 - 3	81	23.62	29	23.58	52	23.64	
≥ 4	76	22.16	15	12.20	61	27.73	
Episodios de malaria por <i>Plasmodium vivax</i> en el último año *							
0	242	70.55	57	46.34	185	84.09	< 0.0001
1	68	19.83	45	36.59	23	10.45	
2 - 3	26	7.58	16	13.01	10	4.55	
≥ 4	7	2.04	5	4.07	2	0.91	

* Diferencia significativa entre sitios (Prueba exacta de Fisher, p -valor < 0.05)

Del mismo modo se describieron las características básicas de los hogares de los individuos (Tabla 2). La presencia de hacinamiento fue calculada como la presencia de más de 3 personas por habitación, donde no se encontró una diferencia significativa entre comunidades (p -valor = 0.0980). El material usado para la construcción de paredes fue la madera en ambas comunidades (79.67%), siendo esta proporción mayor en Cahuide (82.89%) en comparación con Lupuna (77.36%) (p -valor = 0.0400). El principal material de los pisos en las casas de Lupuna fue la tierra (67.92%), mientras que el 44.74% de casas en Cahuide utilizan este mismo material (p -valor < 0.0001). Con respecto a los recursos del hogar, alrededor de 61% de las casas en Cahuide cuentan con acceso a electricidad, en tanto esta proporción se reduce en la comunidad de Lupuna a 24.53% (p -valor < 0.0001). Solo el 24.73% de las casas cuentan con agua potable para el consumo diario y preparación de alimentos, con una marcada diferencia entre comunidades, donde un mayor número de casas de Cahuide tiene más acceso a este recurso (p -valor = 0.0053). La principal fuente de agua fue a través de un pozo (37.36%), seguido por pilón o grifo comunal (31.32), y río o quebrada (26.37%).

Asimismo, se observó una diferencia en las instalaciones sanitarias, donde el 52.63% de las casas en Cahuide cuentan con un pozo ciego o silo, mientras que esta proporción se reduce a 33.96% en Lupuna (p -valor = 0.0293). La mayoría de participantes en Lupuna utilizan el campo abierto, río u otros para el desecho de residuos fecales (42.45%). Con respecto a la eliminación de basura, 48.90% de los hogares en ambas comunidades echan los residuos al campo o río. Además, más del 85% de los hogares reportó usar leña como combustible para cocinar. Por último, se evaluaron los recursos de protección contra el vector. La cobertura de mosquiteros fue sorprendentemente alta en ambas comunidades, Cahuide (94.74%) y Lupuna (97.17%). El material de estos mosquiteros fue mayoritariamente de poliéster impregnadas con insecticida de larga duración (71.43%), teniendo Lupuna (89.62%) una mayor proporción que Cahuide (46.05%) (p -valor < 0.0001)

Tabla 2. Características básicas de los hogares de los participantes del estudio (n = 182)

	Total		Cahuide		Lupuna		p-valor
	n	%	n	%	n	%	
Hacinamiento (>3 personas/habitación)							
Si	91	50.00	44	57.89	47	44.34	0.0980
No	91	50.00	32	42.11	59	55.66	
Material de la pared *							
Estera, Palmera	19	10.44	6	7.89	13	12.26	0.0400
Plástico	6	3.30	5	6.58	1	0.94	
Madera	145	79.67	63	82.89	82	77.36	
Ladrillo	12	6.59	2	2.63	10	9.43	
Material del piso *							
Tierra	106	58.24	34	44.74	72	67.92	< 0.0001
Cemento	28	15.38	7	9.21	21	19.81	
Madera	43	23.63	33	43.42	10	9.43	
Pona, otros	5	2.75	2	2.63	3	2.83	
Material del techo							
Palmera	139	76.37	61	80.26	78	73.58	0.3767
Calamina, Plástico	43	23.63	15	19.74	28	26.42	
Electricidad *							
Si	72	39.56	46	60.53	26	24.53	< 0.0001
No	110	60.44	30	39.47	80	75.47	
Agua potable para el consumo *							
Si	45	24.73	27	35.53	18	16.98	0.0053
No	137	75.27	49	64.47	88	83.02	
Fuente de agua *							
Red pública	4	2.20	3	3.95	1	0.94	0.0394
Pilón o grifo comunal	57	31.32	22	28.95	35	33.02	
Río, Quebrada	48	26.37	21	27.63	27	25.47	
Pozo	68	37.36	25	32.89	43	40.57	
Dato faltante	5	2.75	5	6.58	0	0.00	
Instalación sanitaria *							
Letrina	41	22.53	16	21.05	25	23.58	0.0293
Pozo ciego, Silo	76	41.76	40	52.63	36	33.96	
Campo abierto, Río, otros	65	35.71	20	26.32	45	42.45	
Eliminación de basura *							
Quemar la basura	60	32.97	24	31.58	36	33.96	0.0166
Enterrar la basura	28	15.38	19	25.00	9	8.49	
Campo, río	89	48.90	32	42.11	57	53.77	
Dato faltante u otros	5	2.75	1	1.32	4	3.77	
Combustible para cocinar *							
Gas	7	3.85	2	2.63	5	4.72	0.0021

Kerosene, Carbón	14	7.69	12	15.79	2	1.89	
Leña	159	87.36	61	80.26	98	92.45	
Dato faltante u otros	2	1.10	1	1.32	1	0.94	
Cobertura de los mosquiteros (mosquiteros/camas), %.							
<80	7	4.83	4	5.26	3	2.83	0.4536
≥80	175	96.15	72	94.74	103	97.17	
Material de los mosquiteros *							
Tocuyo	37	20.33	31	40.79	6	5.66	< 0.0001
Nylon	13	7.14	8	10.53	5	4.72	
Olyset/Permanet	130	71.43	35	46.05	95	89.62	
Otros	2	1.10	2	2.63	0	0.00	

* Diferencia significativa entre sitios (Prueba exacta de Fisher, p -valor < 0,05)

4.2 Tiempo de infección y características de las infecciones recurrentes por *Plasmodium vivax*.

Se evaluaron las características de las recurrencias detectadas por microscopía y por PCR (Tabla 3). En la comunidad de Cahuide, 32.5% (40/123) de los individuos presentaron al menos una recurrencia a través de la detección solo por microscopía, mientras que, al usar el diagnóstico por PCR, esta proporción aumento a 43.09% (53/123). La misma tendencia se observó en la comunidad de Lupuna, donde a través de PCR se determinó que cerca del 65% (142/220) de los individuos presentaron al menos una recurrencia en los 3 años de seguimiento, sin embargo, a través de microscopía solo 103 personas presentaron recurrencias (46.82%, 103/220). Para ambas comunidades, la mayoría de individuos solo experimentó una recurrencia (67.69% para PCR, y 55.94% para microscopía), sin embargo, una proporción significativa de ellos experimentó dos recurrencias (17.44% PCR, y 26.57% microscopía). En general, el número de recurrencias detectadas por individuo fue de una (mediana = 1, RIQ 1–2). El tiempo de detección de las recurrencias no varió de manera relevante de acuerdo al método de diagnóstico. Alrededor de 40.96% de las recurrencias fueron detectadas a través de microscopía entre 90 y 180 días luego de una infección microscópica inicial. Al contrario, con la detección por PCR, 36.09% de las recurrencias fueron detectadas entre este mismo periodo.

Tabla 3. Características de las recurrencias por *P. vivax* entre enero de 2013 y diciembre de 2015.

	Cahuide		Lupuna		Total	
	n	%	n	%	n	%
Número de individuos	123	100	220	100	343	100
Recurrencias detectadas por PCR						
Individuos libres de recurrencia	70	56.91	78	35.45	148	43.15
Individuos con recurrencia	53	43.09	142	64.55	195	56.85

1 recurrencia	45	84.91	87	61.27	132	67.69
2 recurrencias	7	13.21	27	19.01	34	17.44
3 recurrencias	0	0.00	19	13.38	19	9.74
4+ recurrencias	1	1.89	9	6.34	10	5.13
Número total de recurrencias detectadas	64		238		302	
Número de recurrencias/individuo (Mediana [RIQ]; máx.)	1 [1 – 2], 5		1 [1 – 2], 6		1 [1 – 2], 6	
Tiempo de detección de las recurrencias						
0 - 90 días	26	40.63	67	28.15	93	30.79
90 - 180 días	24	37.50	85	35.71	109	36.09
>180 días	14	21.88	86	36.13	100	33.11
Recurrencias detectadas por microscopía						
Individuos libres de recurrencia	83	67.48	117	53.18	200	58.31
Individuos con recurrencia	40	32.52	103	46.82	143	41.69
1 recurrencia	29	72.50	51	49.51	80	55.94
2 recurrencias	10	25.00	28	27.18	38	26.57
3 recurrencias	0	0.00	15	14.56	15	10.49
4+ recurrencias	1	2.50	9	8.74	10	6.99
Número total de recurrencias detectadas	54		195		249	
Número de recurrencias/individuo (Mediana [RIQ]; máx.)	1 [1 – 2], 5		2 [1 – 2], 7		1 [1 – 2], 7	
Tiempo de detección de las recurrencias						
0 - 90 días	29	53.70	52	26.67	81	32.53
90 - 180 días	17	31.48	85	43.59	102	40.96
>180 días	8	14.81	58	29.74	66	26.51

RIQ: Rango Inter cuartil, máx.: valor máximo

La probabilidad de permanecer libre de recurrencias al día 180 fue de 66.0% (95% IC [62.1; 70.1]) para microscopía, y 62.6% (95% IC [58.6; 66.9]) para PCR (Fig. 6A). Asimismo, al comparar las curvas de supervivencia entre los dos tipos de detección, se encontraron diferencias significativas (Log-Rank Test, p -valor = 0.0013, Fig. 6A). La mediana del tiempo de permanecer libre de recurrencia fue 366 días por microscopía, mientras que solo por PCR fue de 273 días. Esto significa que la mitad de los individuos seguidos experimentó una recurrencia al noveno mes de seguimiento, sin embargo, tomando en cuenta solo microscopía, el actual método de diagnóstico del Programa Nacional de Malaria, esta cifra aumenta al duodécimo mes de seguimiento. Igualmente se evaluó la probabilidad de permanecer libre de infección por malaria solo tomando en cuenta la primera recurrencia de cada individuo (Fig. 6B). Al día 180, esta probabilidad fue de 72.5% (95% IC [67.7; 77.6]) para microscopía y de, 70.37% (95% IC [65.46; 75.6]) para PCR (Fig. 6B). De igual manera se observaron diferencias significativas en las curvas de supervivencia entre los dos métodos de detección (Log-Rank Test, p -valor = 0.0019, Fig. 6B).

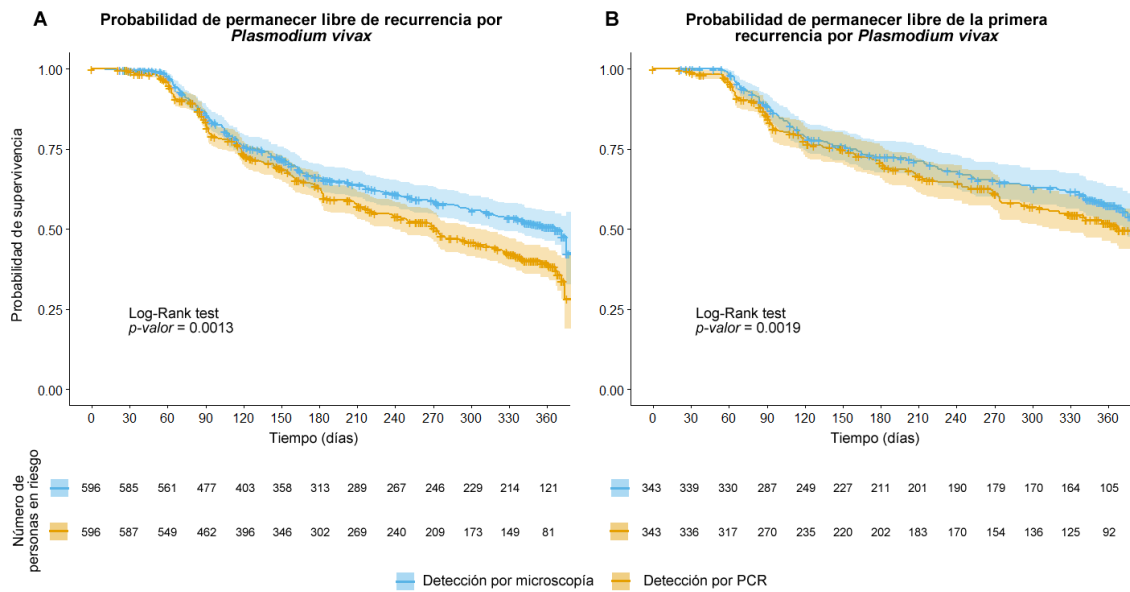


Figura 6. (A) Probabilidad de Kaplan-Meier de permanecer libre de recurrencias por *Plasmodium vivax* según el método de detección. (B) Probabilidad de Kaplan-Meier de permanecer libre de la primera recurrencia por *Plasmodium vivax* según el método de detección. Los métodos de detección incluyen la detección solo por microscopía, solo por PCR, y ambos métodos de diagnóstico. La comparación entre curvas de supervivencia se analizó con el test Log-Rank.

Luego, se procedió a analizar la función de riesgo acumulado según el método de detección y las variables sociodemográficas intrínsecas al individuo (Fig. 7, Fig. S1). La mediana del tiempo transcurrido hasta una recurrencia de malaria fue mayor en las personas provenientes de la comunidad de Cahuide comparado a los provenientes de Lupuna para la detección por microscopía (Log-Rank Test, *p*-valor = 0.0046, Fig. 7A, Tabla S1) y por PCR (Log-Rank Test, *p*-valor < 0.001, Fig. 7B, Tabla S1). De este modo, la mitad de los individuos de Lupuna presentaron una recurrencia entre el octavo (a través de PCR) y décimo (a través de microscopía) mes de seguimiento, mientras que, para Cahuide, los individuos lo presentaron luego de un año (ambos métodos). A través de la detección por PCR, la incidencia acumulada de presentar una recurrencia al día 180 fue de 32.6% (95% IC [24.2; 39.6], 79 recurrencias) para Cahuide y 39.7% (95% IC [34.5; 44.46], 214 recurrencias) para Lupuna.

Asimismo, previamente se ha descrito las diferentes respuestas inmunes según el grupo etario y su riesgo de presentar recurrencias. Al comparar individuos menores de 15 años y mayores de 15 de años, se determinó diferencias significativas para el tiempo de detección de las recurrencias por microscopía (Log-Rank Test, *p*-valor = 0.024, Fig. 7C, Tabla S1), y PCR (Log-Rank Test, *p*-valor = 0.033, Fig. 7D, Tabla S1). Curiosamente, al día 180 de seguimiento, los individuos menores de 15 años

presentaron una incidencia acumulada del 34.5% (95% IC [28.4; 40.0], 144 recurrencias) con PCR; mientras que los mayores de 15 años, 40.3% (95% IC [34.2; 45.9], 150 recurrencias) (Fig. 7D, Tabla S1). Por el contrario, esta relación se invierte cuando se evalúa por microscopía ya que los individuos menores de 15 años (38.9%, 95% IC [32.6; 44.6], 158 recurrencias) presentaron un mayor riesgo a presentar recurrencias que los individuos mayores de 15 años (30.0%, 95% IC [24.3; 35.2], 125 recurrencias) (Fig. 7C, Tabla S1).

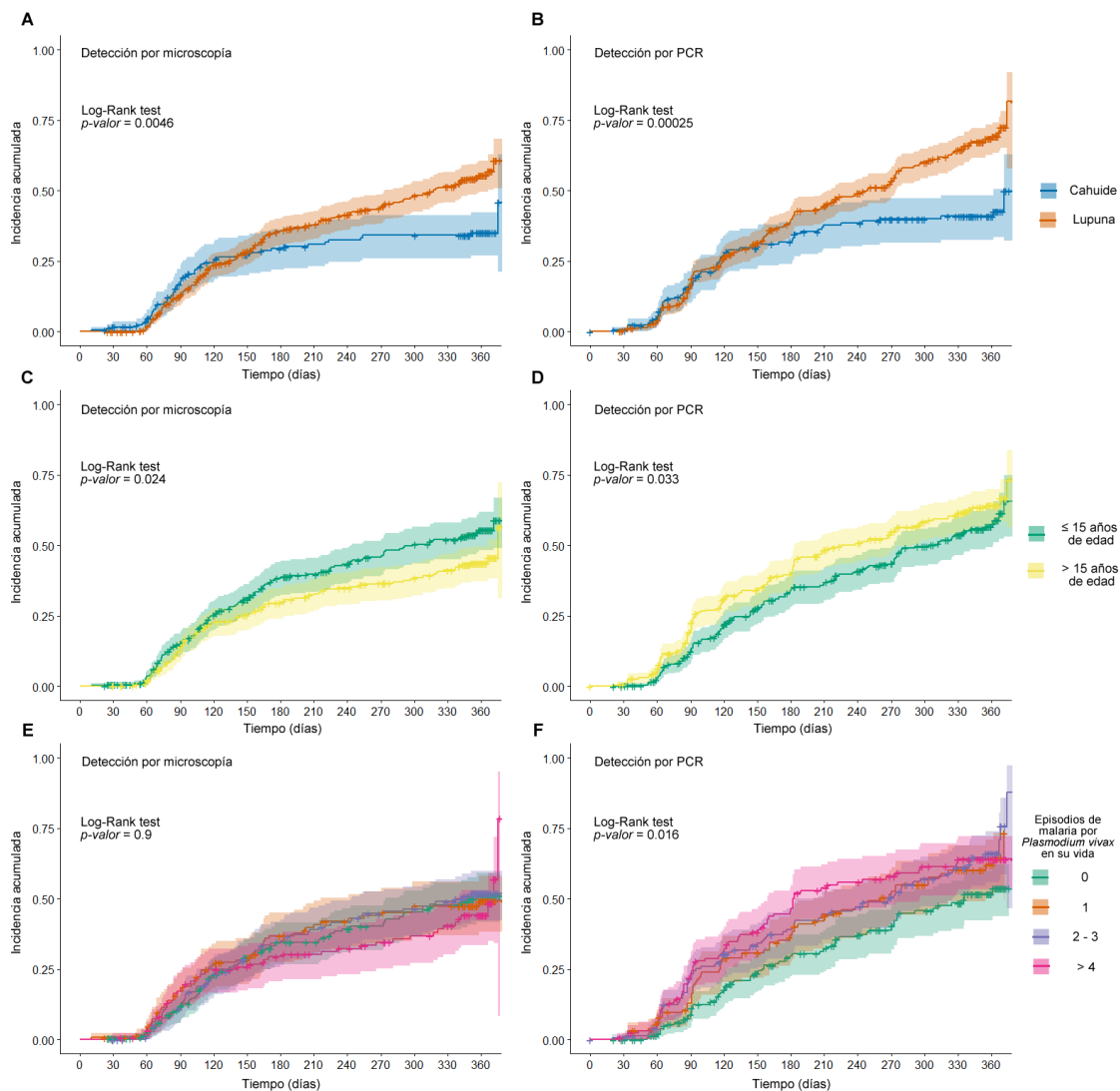


Figura 7. Riesgo acumulado de presentar infecciones recurrentes por *Plasmodium vivax* según la comunidad (Cahuide y Lupuna) a través de la detección por microscopía (A), y la detección por PCR (B). Riesgo acumulado de presentar infecciones recurrentes por *Plasmodium vivax* según el grupo etario (menores de 15 años y mayores de 15 años) a través de la detección por microscopía (C), y la detección por PCR (D). Riesgo acumulado de presentar infecciones recurrentes por *Plasmodium vivax* según el número de episodios previos de malaria en su vida a través de la detección por microscopía (E), y la detección por PCR (F). La comparación entre curvas de supervivencia se realizó con el test Log-Rank.

De la misma forma, se evaluó la asociación de episodios previos de malaria con el riesgo y tiempo de presentar una recurrencia. Al evaluar la incidencia acumulada de acuerdo a microscopía, no se encontró diferencias significativas entre los grupos (Log-Rank Test, p -valor = 0.9, Fig. 7E, Tabla S1). Sin embargo, a través de la detección por PCR, la mediana del tiempo transcurrido hasta una recurrencia de malaria fue mayor en individuos que no presentaron infecciones previas (Me = 336 días), seguido por individuos con dos o tres infecciones previas (Me = 269 días), una infección previa (Me = 260 días) y más de 4 infecciones previas (Me = 182 días) (Log-Rank Test, p -valor = 0.016, Fig. 7F, Tabla S1). Por último, las tasas de incidencia no variaron de acuerdo a sexo (Log-Rank Test; Microscopía: p -valor = 0.42, Fig. S1A; PCR: p -valor = 0.9, Fig. S1B; Tabla S1), tipo de ocupación (Log-Rank Test; Microscopía: p -valor = 0.05, Fig. S1C; PCR: p -valor = 0.56, Fig. S1D; Tabla S1), y número de episodios de malaria en el último año (Log-Rank Test; Microscopía: p -valor = 0.37, Fig. S1E; PCR: p -valor = 0.98, Fig. S1F; Tabla S1).

4.3 Factores asociados al tiempo de detección de una infección recurrente

Se realizó el análisis univariado usando la regresión de Cox para determinar qué factores están asociados al tiempo de detección de una infección recurrente usando PCR y microscopía (Fig. 8, Tabla S2). Para la primera recurrencia detectada por microscopía, haber tenido más de 15 años de edad disminuyó el riesgo de presentar una recurrencia en 33.2% (95% IC [5.8; 52.6], p -valor = 0.0213). Tal como se observó en las curvas de Kaplan-Meier (Fig. 7C, 7D), esta relación se invierte en la detección por PCR, por lo que los individuos mayores de 15 años presentaron mayor riesgo de acuerdo a la primera recurrencia (HR = 1.45, p -valor = 0.0179, Fig. 8, Tabla S2). Asimismo, a través de PCR, haber residido en la comunidad de Lupuna, y haber presentado 2 o más episodios de malaria en su vida también aumentó el riesgo de presentar una recurrencia en 51.0% (95% IC [7.0; 113.0], p -valor = 0.0182), y 64.0% (95% IC [21.0; 123.0], p -valor = 0.0015) respectivamente. Al evaluar todas las recurrencias por microscopía, la variable de edad se mantuvo significativa, de este modo funciona como factor protector (HR = 0.751, p -valor = 0.0242, Tabla S2). Además, se encontró que el riesgo es 1.54 veces mayor en un individuo que residió en la comunidad de Lupuna a comparación de un individuo que residió en Cahuide (p -valor = 0.0005). Para la detección de todas las recurrencias por PCR, haber residido en Lupuna (HR = 1.67, p -valor = 0.0003, Tabla S2), haber tenido más de 15 años de edad (HR = 1.28, p -valor = 0.0332, Tabla S2),

haber presentado 2 o más episodios de malaria en su vida (HR = 1.35, p -valor = 0.00992, Tabla S2) presentaron un mayor riesgo. Además, se encontró que el riesgo es 1.73 veces mayor en individuos que utilizaban mosquiteros de material Olyset/Permanet que individuos que no usaban mosquiteros o usaban otro material (p -valor = 0.0335). Las variables como sexo, ocupación al aire libre, episodios de malaria por *Plasmodium vivax* en el último año, hacinamiento, presencia de pared de madera, presencia de piso de tierra no se encontraron asociadas al riesgo de detección de una infección recurrente.

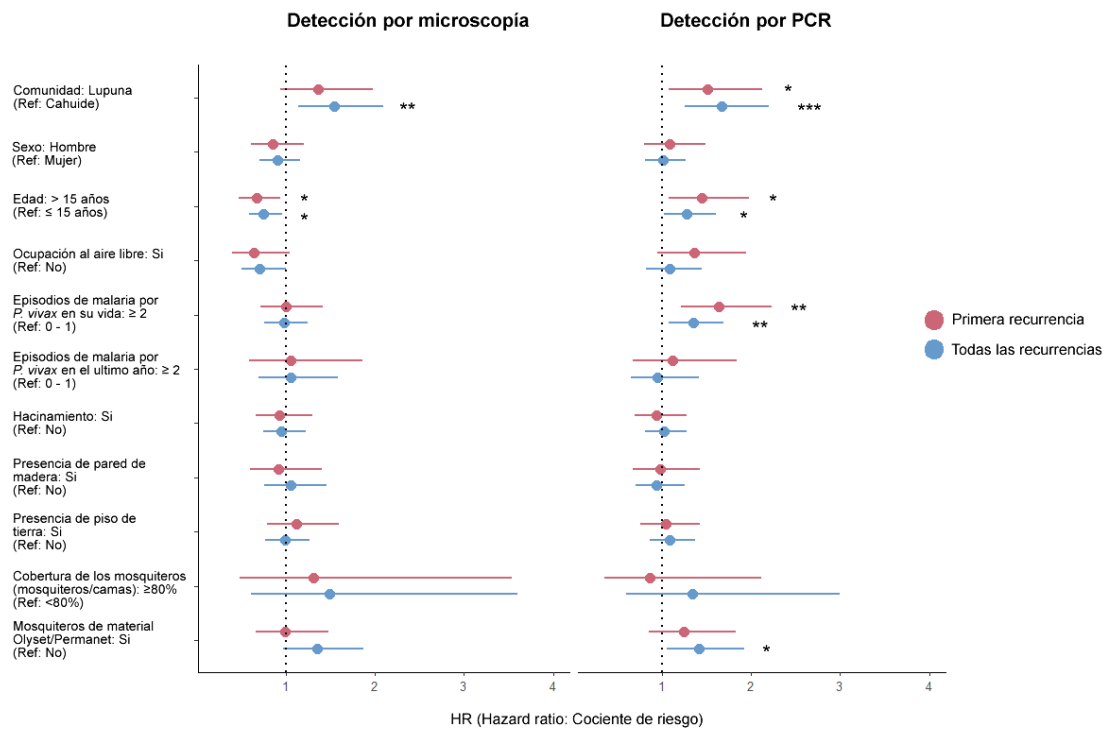


Figura 8. Factores de riesgo asociados al tiempo de detección de recurrencias por *Plasmodium vivax* a través de microscopía y PCR. Forest plot de los cocientes de riesgo de las variables sociodemográficas y su asociación con la detección de recurrencias de acuerdo a la primera recurrencia y todas las recurrencias, dividido de acuerdo al método de detección. Diferencia significativa entre sitios: *, p -valor < 0.05; **, p -valor < 0.01; ***, p -valor < 0.001.

Factores como comunidad, edad, y episodios de malaria por *Plasmodium vivax* en su vida fueron considerados potencial factores para el modelo final del riesgo considerando solo la primera recurrencia (Fig. 8, Tabla S2). Mientras que factores como comunidad, episodios de malaria por *Plasmodium vivax* en su vida, edad, ocupación al aire libre y el material de los mosquiteros fueron incluidos en el modelo final del riesgo considerando todas las recurrencias (Fig. 8, Tabla S2). Se realizaron los análisis multivariados considerando la detección por PCR y microscopía (Tabla 4) y, además, al verificar el supuesto de riesgos proporcionales, el análisis tuvo que estratificarse por comunidad. La principal variable identificada como potencial factor de riesgo para la primera y todas las recurrencias detectadas por PCR fue haber presentado dos o más

episodios de malaria en su vida. Esta presentó un aumento en el riesgo de entre 32% (95% IC [0; 74.0], *p*-valor = 0.046) y 59% (95% IC [5.0; 140.0], *p*-valor = 0.028) para la comunidad de Lupuna (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis de factores de riesgo ajustado por variables para la primera recurrencia y para todas las recurrencias según la detección de PCR y microscopía

	Primera recurrencia	Cahuite			Lupuna		
		HR	95% IC	<i>p</i> -valor	HR	95% IC	<i>p</i> -valor
Detección por Microscopía	Edad						
	≤ 15 años	1			1		
	> 15 años	1.01	0.50 - 2.04	0.974	0.64	0.40 - 1.00	0.0542
	Ocupación al aire libre (leñador, pescador o agricultor)						
	No	1			1		
	Si	0.89	0.34 - 2.31	0.804	0.72	0.37 - 1.34	0.2804
	Todas las recurrencias						
	Edad						
	≤ 15 años	1			1		
	> 15 años	1.12	0.62 - 2.02	0.707	0.77	0.56 - 1.07	0.119
	Ocupación al aire libre (leñador, pescador o agricultor)						
	No	1			1		
	Si	0.85	0.38 - 1.92	0.698	0.74	0.47 - 1.16	0.191
	Mosquiteros de material Olyset/Permanet						
No	1			1			
Si	0.80	0.46 - 1.40	0.427	1.40	0.8 - 2.4	0.231	
Detección por PCR	Primera recurrencia						
	Edad						
	≤ 15 años	1			1		
	> 15 años	1.88	0.92 - 3.9	0.0842	1.00	0.65 - 1.54	0.999
	Ocupación al aire libre (leñador, pescador o agricultor)						
	No	1			1		
	Si	0.81	0.36 - 1.84	0.6138	1.13	0.70 - 1.82	0.613
	Episodios de malaria por <i>Plasmodium vivax</i> en su vida						
	0 - 1	1			1		
	≥ 2	1.13	0.59 - 2.19	0.7068	1.59	1.05 - 2.40	0.028
	Todas las recurrencias						
	Edad						
	≤ 15 años	1			1		
	> 15 años	1.39	0.80 - 2.44	0.247	1.20	0.91 - 1.58	0.187
Episodios de malaria por <i>Plasmodium vivax</i> en su vida							
0 - 1	1			1			
≥ 2	0.83	0.47 - 1.47	0.527	1.32	1.00 - 1.74	0.046	
Mosquiteros de material Olyset/Permanet							
No	1			1			
Si	0.99	0.60 - 1.63	0.977	1.409	0.86 - 2.31	0.176	

4.4 Evolución de las infecciones submicroscópicas.

La evolución de las infecciones fue evaluada frente a dos posibles escenarios: (i) el individuo con infección submicroscópica inicial evolucione a una infección microscópica y, (ii) el individuo con infección submicroscópica se vuelva indetectable (Fig. 5). Frente a estos dos escenarios se evaluó la densidad de incidencia, donde los 343 individuos fueron incluidos (Tabla 5). Se determinó un total de 280.53 personas – año con 4 casos de evolución de submicroscópico a microscópico y de 64 casos de evolución de submicroscópico a indetectable. La densidad de incidencia de presentar una evolución de infección submicroscópica a una infección microscópica fue de 1.43 nuevos casos por cada 100 personas – año de seguimiento. De la misma manera, la densidad de incidencia de presentar una infección submicroscópica y que esta se vuelva indetectable con el tiempo es de 22.81 nuevos casos por cada 100 personas – año de seguimiento (Tabla 5).

Tabla 5. Incidencia de evolución de infecciones submicroscópicas para *P. vivax* durante la cohorte de 3 años (n = 343)

Evolución	De una infección submicroscópica a una infección microscópica	De una infección submicroscópica a una infección submicroscópica indetectable
Casos	4	64
Persona - año	280.53	280.53
DI	1.43	22.81

* DI: Densidad de incidencia calculado para 100 personas-año.

La mediana del tiempo de evolución de una infección submicroscópica a una infección microscópica fue de 29.5 días (RIQ [28.0; 92.0]). Por otro lado, la mediana del tiempo de evolución de una infección submicroscópica a una infección indetectable fue de 35.5 días (RIQ [31.0; 38.0]), es decir, que el 50% de los individuos que presentaron este escenario la infección submicroscópica se resolvió en un mes (Fig. 9). De la misma manera, para el segundo mes (día 60), 76.56% (95% IC [63.5; 84.95]) de los individuos presentaron infecciones submicroscópicas indetectables, mientras que para el tercer mes (día 90), fueron 89.06% (95% IC [78.0; 94.56]) de los individuos.

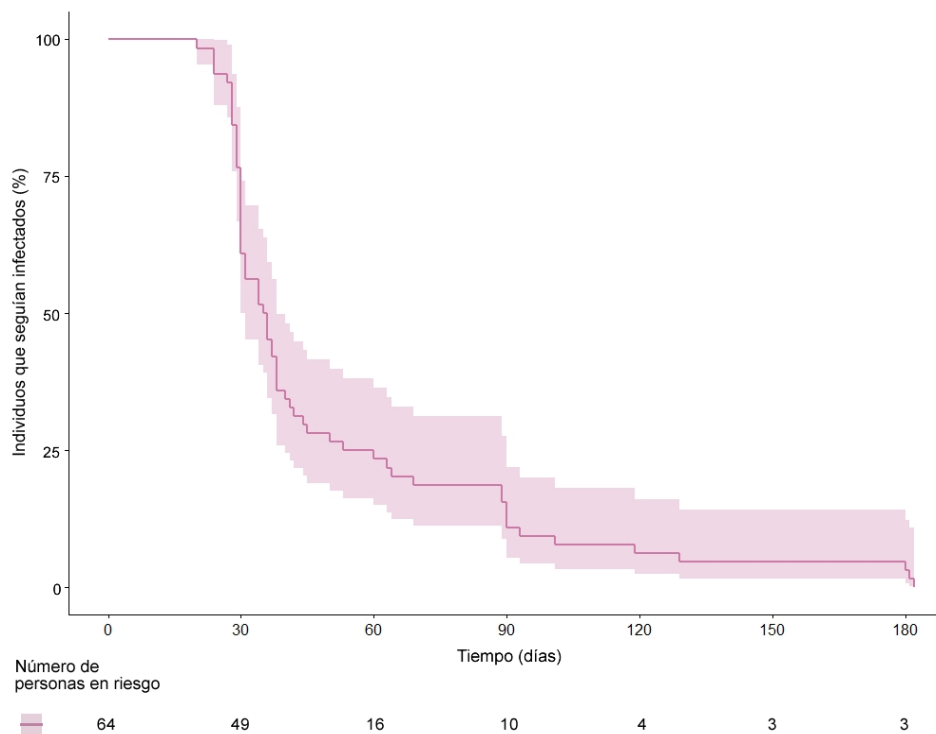


Figura 9. Persistencia y tiempo de evolución de las infecciones submicroscópicas a infecciones indetectables.

Dentro de las características de las personas que experimentaron la evolución de una infección submicroscópica a una infección microscópica se observó que el 75% (3/4) de los individuos eran mujeres y menores de 15 de años. Entre ellos, reportaron que no sufrieron ninguna infección previa de malaria en el último año o en su vida. Todos reportaron vivir en hacinamiento, en hogares con piso de tierra, paredes de madera, y techo de palmera. No obstante, presentaron una cobertura de mosquiteros mayor al 80%, siendo Olyset/Permanet el material predominante. Por otro lado, dentro de las características de las personas que experimentaron la evolución de una infección submicroscópica a una infección indetectable se observó que el 64.06% (41/64) de los individuos eran mujeres y aproximadamente 80% (51/64) mayores de 15 de años. En total 42 individuos (65.62%) reportaron no haber presentado una infección por malaria en el último año, sin embargo, el 96.87% reportó haber experimentado al menos una infección por *Plasmodium vivax* en toda su vida. El material predominante de los hogares de estos individuos fue paredes de madera (82.81%, 53/64), pisos de tierra (67.19%, 43/64), y techo de palmera (81.25%, 52/64).

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

El estudio de las infecciones recurrentes submicroscópicas es esencial para entender la epidemiología de la malaria en el Perú, esto con el fin de proponer mejores medidas de control y eliminación de la enfermedad. Aquí, se ha provisto de un detallado análisis sobre las características como tiempo de detección, factores asociados y evolución de las infecciones recurrentes durante el seguimiento de individuos por 3 años en dos comunidades de la Amazonia. Se mostro la diferencia entre la detección de recurrencias usando dos métodos de diagnóstico como microscopía y PCR, así como la diferencia en permanecer libre de recurrencia. Además, se mostraron los factores asociados al tiempo de detección de las recurrencias y como estas pueden cambiar de acuerdo al método. Por último, se determinó cuan común es la evolución de las infecciones submicroscópicas a infecciones microscópicas, y a que se resuelvan por sí solas o que se vuelvan indetectables.

En la Amazonía Peruana, la transmisión de *P. vivax* está caracterizada por tener un patrón heterogéneo, fuertemente ligado a las características sociodemográficas de las comunidades (8) (Tabla 1, Tabla 2). Se determinó que una gran proporción de los individuos de Lupuna han presentado múltiples infecciones de malaria a lo largo de su vida, sin embargo, estas no ocurrieron en el último año (Tabla 1). Siendo así que los individuos de Cahuide han estado expuesto a infecciones más recientes, por lo que su perfil inmunológico podría revelar diferencias en el número de recurrencias o el tiempo de aparición de estas. Dentro de la movilidad humana, se encontró que Lupuna es una comunidad más estable, con un bajo porcentaje de migración. En base a las características de los hogares, como la presencia de electricidad, agua potable para el consumo humano, instalación sanitaria, el tipo de combustible para cocinar, entre otros, se deduce que los individuos de Cahuide cuentan con una mayor disponibilidad de recursos (Tabla 2). Por ejemplo, el número de hogares con acceso a electricidad y agua potable es mayor en Cahuide que en Lupuna. Si bien el grado de cobertura fue similar en ambos sitios de estudio, el tipo de material de los mosquiteros difirió. En Lupuna el principal material encontrado fue Olyset/Permanet, recomendado para la protección contra mosquitos, mientras que en Cahuide una gran proporción de casas usaba tocuyo.

Esta diferencia puede generar diferencias en el grado de protección y por ende a la susceptibilidad de presentar nuevas infecciones de malaria. Previamente estas características ya han sido descritas para ambas comunidades (36,38). Cahuide ha sido caracterizada como una comunidad con transmisión residual persistente debido a los constantes cambios en la incidencia de malaria (36,38). Esto ha sido asociado con la tasa de picaduras de *An. darlingi* en humanos y los niveles de agua de los ríos. Continuas lluvias e inundaciones, previas al inicio de la cohorte, pudieron aumentar el número de sitios para el desarrollo de mosquitos, incrementando así el número de infecciones e incidencia. Por otro lado, Lupuna ha sido caracterizada como una comunidad de transmisión estacional (36,38). Si bien las inundaciones también tuvieron efecto en la incidencia de malaria de esta comunidad, se sugirió que las infecciones submicroscópicas y asintomáticos se mantuvieron aun en temporada de baja transmisión. Se concluyó que debido a que el efecto de las inundaciones fue menor en Lupuna, las recurrencias, principalmente por relapsos, y no el contacto con el vector, fue lo que ha mantenido la transmisión en la comunidad (36,38). Al considerar el contexto sociodemográfico de cada comunidad y cuan específica pueden ser las características y condiciones, fue importante evaluar al sitio de procedencia como una variable independiente.

Las recurrencias por *P. vivax* han sido un gran obstáculo en la eliminación de la enfermedad. Estas tienen tres orígenes (46): (i) la activación de los hipnozoitos, fase latente del parásito en el hígado, que genera relapsos durante las siguientes semanas o hasta meses después del tratamiento; (ii) la recrudescencia de la infección, la cual es la reaparición de las fases hemáticas; y (iii) la reinfección por un nuevo parásito luego del tratamiento. Sin embargo, a pesar del avance de herramientas de secuenciamiento y bioinformáticas, determinar el origen de la recurrencia es aún complicado. En el caso de la Amazonía, se observaron tasas de recurrencia desde 10.3% hasta 57%, tomando en cuenta que muchos de los pacientes presentaron hasta más de un episodio durante los seguimientos (47–50,53). En este estudio, dentro de los 343 participantes, un total de 195 individuos presentaron recurrencias detectadas por PCR, siendo casi el 75% de estos provenientes de la comunidad de Lupuna (Tabla 3). Cuando se analiza esta cohorte usando el método de microscopía la cantidad de individuos que experimentaron al menos una recurrencia se reduce a 143 personas, siendo asimismo la mayoría de Lupuna (Tabla 3). Estos resultados iniciales nos indica que solo el uso de microscopía no detectaría las recurrencias, por ende, infecciones no tratadas podrían funcionar como reservorios del parásito y mantener la transmisión. El tiempo de detección de las

recurrencias también varió de acuerdo al método de diagnóstico y la comunidad. Según microscopía, en Cahuide, la mayor proporción de infecciones fue detectada luego de los tres primeros meses de la infección microscópica, mientras que en Lupuna, la mayor proporción fue detectada entre tres a seis meses luego de la infección microscópica inicial. Estudios en países sudamericanos, con un perfil epidemiológico similar al peruano, han reportado tiempos de detección parecidos. En Brasil, en un estudio que involucro cerca de 30,000 posibles recurrencias, la mediana del tiempo a la primera recurrencia fue 71 días, y 69 días si incluían todas las recurrencias (67). De la misma forma, en Colombia, con un seguimiento de casi seis meses a 134 pacientes, determinó que el tiempo promedio a la primera recurrencia fue entre 51 a 110 días (68). Por otro lado, en Myanmar, a través de un seguimiento de un año, determinaron que la mediana del tiempo a la primera recurrencia fue de casi 3 meses, asimismo, esta se reducía en la subsiguientes recurrencias (69). Teniendo en cuenta esto, junto con nuestros resultados, se sugiere que periodos largos y rigurosos de seguimiento permitirían detectar mayor cantidad de recurrencias, esto especialmente en la región de Loreto donde el tiempo de detección parecería variar de acuerdo a la comunidad de procedencia.

Hasta ahora, el método molecular de PCR permitió detectar de manera más eficiente las recurrencias en comparación que la microscopía. La probabilidad de permanecer libre de recurrencias fue mayor a través de microscopía (Fig. 6). En otras palabras, el tiempo para detectar las recurrencias fue menor mediante el PCR, es decir, la mitad de la cohorte había experimentado una recurrencia para el noveno mes de seguimiento, mientras que para microscopía esto ocurre luego de un año de seguimiento. Esto sugiere que, si se mantiene con una estrategia de diagnóstico solo usando microscopía, es posible no detectar y por ende no tratar posibles infecciones. En escenarios epidemiológicos como el de nuestra Amazonia, con un perfil de malaria residual, estos casos submicroscópicos podría ser el factor que mantiene la transmisión. Un estudio cohorte en Vietnam también demostró que el PCR detectaba de manera más oportuna las recurrencias (64). La mediana del tiempo que permanecer libre de recurrencia detectada por PCR fue de 174 días, mientras que este tiempo fue más del doble (356 días) para la detección por microscopía (64). De igual importancia, se pudo determinar que los individuos de Lupuna presentaban un mayor riesgo de presentar una recurrencia más próxima a la infección inicial que los individuos de Cahuide (Fig. 7A, 7B). Justamente, durante la cohorte se determinó un mayor número de recurrencias en Lupuna, asociado al mayor número de personas seguidas, pero también posiblemente a las diferencias ecológicas y sociodemográficas. Dentro del grupo etario se encontró que

los individuos menores de 15 años tenían un mayor riesgo a través de microscopía, sin embargo, esta relación se invierte cuando se usa PCR, siendo el grupo de mayores de 15 años el grupo en riesgo (Fig. 7C, 7D). Tomando en cuenta PCR, el método que pudo detectar mayor número de recurrencias, los individuos adultos presentarían recurrencias más próximas. Esto se explica con el grado de exposición que estos individuos tienen, debido al trabajo, viajes, etc. También se ha demostrado que los perfiles inmunológicos pueden variar de acuerdo a la edad (70–72). Por último, también se identificó que haber experimentado más de cuatro episodios de malaria por *Plasmodium vivax* en su vida presentaba mayor riesgo con respecto a otros grupos con menores recurrencias (Fig. 7E, 7F). A pesar de haber generado inmunidad por las múltiples inoculaciones previas, es posible que esta protección sea de corta duración permitiendo así que estos individuos presente más recurrencias en un tiempo más corto (70).

Una parte importante de los análisis incluyó determinar qué factores sociodemográficos se encuentran asociados con el tiempo de detección de las recurrencias. Se encontró que la comunidad de procedencia, la edad, el número de infecciones previas de malaria y el tipo de mosquitero estaban asociados a las recurrencias (Fig. 8, Tabla 4). Inicialmente se observó diferencias significativas en las características sociodemográficas de ambas comunidades, principalmente en la disponibilidad de recursos. El efecto de las pobres condiciones de vivienda sobre la incidencia de malaria se encuentra bien caracterizada, donde las personas de bajo recursos no pueden obtener medidas preventivas efectivas (36,73). A esto se suma que en Lupuna la principal actividad es la agricultura, mientras que Cahuide se ha establecido como una zona de deforestación, lo que predispone a la formación de criaderos de mosquitos (36). En ambos escenarios existe el riesgo a la exposición de la enfermedad y por ende a recurrencias. El segundo factor asociado encontrado al tiempo de las recurrencias es el grupo etario. Se ha demostrado que la parasitemia es dependiente de la edad, y va declinando con el tiempo. En condiciones con exposición crónica, se sugiere que los adultos desarrollan una inmunidad antiparasitaria y clínica más rápida que los niños o adolescentes (70,74). Sin embargo, en condiciones de exposición aguda como en la Amazonia Peruana, los adultos presentan un mayor riesgo de contraer malaria (70,74). Por ello, la edad en que el individuo se encuentre expuesto a la primera infección de su vida es un importante modelador de la adquisición natural de la inmunidad de la malaria (74). Con respecto a la asociación con el número de infecciones previas de malaria, se ha reconocido que la tasa de inoculación entomológica es una medida directa de la intensidad de transmisión de la enfermedad, y

además se encuentra asociada a la densidad de la parasitemia (70). Haber estado expuesto múltiples veces predispone a desarrollar una inmunidad adquirida, sin embargo, se puede ver afectada por la carga parasitaria. Por ejemplo, otros estudios sobre los factores de riesgo a desarrollar recurrencias encontraron resultados diferentes, lo que se explica con el contexto epidemiológico único de cada país. En Brasil, se determinó que el riesgo de recurrencia disminuía con el incremento de la edad, algo opuesto a lo que se observó en este estudio. Otros factores asociados a un menor tiempo hasta la recurrencia fueron los individuos menores de 3 años, el sexo masculino, la ausencia de tratamiento contra hipnozoitos y la ocupación doméstica (67). Por otro lado, en Tailandia (69) y Colombia (68), los hombres también presentaron un mayor riesgo a presentar múltiples episodios de malaria a comparación de las mujeres, sin embargo, esto no se observó en nuestro estudio.

El comportamiento individual de las infecciones submicroscópicas es un factor importante a tomar en cuenta al evaluar la evolución de estas infecciones. Frente a esto se planteó analizar la incidencia de dos escenarios: (i) que un individuo con infección submicroscópica inicial evolucione a una infección microscópica y, (ii) que un individuo con infección submicroscópica se vuelva indetectable. En base a esto se determinó que la densidad de incidencia de la conversión de submicroscópico a indetectable fue casi 16 veces la densidad de incidencia de la conversión de submicroscópico a microscópico. Un estudio con el mismo enfoque, pero con seguimiento por 4 semanas, encontró una mayor proporción de casos de evolución a una infección indetectable, con una incidencia de 32.54 casos por cada persona-año, mientras que la evolución a una infección microscópica presentó una incidencia de 10.47 casos por cada persona-año (75). Si bien se observaron mayores tasas, se debe recalcar que el seguimiento fue por un mes, donde la probabilidad de detectar las conversiones es mayor debido a la proximidad del tratamiento. La importancia epidemiológica del primer escenario recae en que, durante tres años de seguimiento, fueron solo 4 casos donde la infección submicroscópica evolucionó a una microscópica. Esto significa que, a pesar de presentar infecciones submicroscópicas previas, estos pacientes fueron recién tratados, en teoría, cuando la infección microscópica fue detectada. Previamente se ha demostrado que las infecciones submicroscópicas son un predictor para futuras infecciones microscópicas, fuertemente ligado a la densidad parasitaria, y al gran riesgo de exposición de poblaciones de alta prevalencia (76), contexto que no aplica para la Perú. Otro ejemplo en la Amazonia Brasileña, se observó que solo el 17 % (9/53) de infecciones submicroscópicas asintomáticas evolucionaron

luego de seis meses a infecciones clínicas que pudieron ser detectadas por microscopía (35).

Por otro lado, de manera contradictoria, el segundo escenario nos indica que una gran proporción de las infecciones submicroscópicas no tratadas pasarían a ser infecciones indetectables. Sin embargo, la mediana del tiempo de evolución de este escenario fue de 29.5 días, con un 89.06% de probabilidad de que para el tercer mes esta conversión ocurra (Fig. 9). Durante este periodo, estos individuos, al no haber sido ni detectados ni tratados, participan como potenciales reservorios de la enfermedad. A esto se le suma otras variables como movilidad humana que permitirían no solo la transmisión local, sino a otras comunidades de la Amazonia (16,17). El fenómeno de “resolución espontánea” de las infecciones submicroscópicas, que no fueron tratadas, ha sido reportado previamente donde aún no se ha encontrado explicación alguna, pero se sugiere está relacionado a la inmunidad del individuo (77,78). Factores que determinan la ocurrencia, y que podrían explicar la evolución a infecciones indetectables con el tiempo, son el nivel de parasitemia (79) y la proporción de gametocitos presentes (33). Debido a la baja muestra no se realizaron análisis de factores asociados con ambos escenarios, no obstante, en base a las características de los individuos que si experimentaron estas conversiones se sugiere que el sexo, la edad y la exposición previa a infecciones podría determinar la evolución de las infecciones.

La prevalencia de infecciones submicroscópicas en sitios de transmisión heterogénea como la Amazonia nos indica que la transmisión del parásito debe controlarse a través de herramientas moleculares. Las medidas que usan solo microscopía son insuficientes para identificar portadores silenciosos que no saben que llevan la enfermedad y por ende mantienen la transmisión. La identificación y caracterización de las infecciones submicroscópicas debe ser una medida necesaria y debe ser optada por los programas de salud pública.

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES

Se concluye que la probabilidad de permanecer libre de una recurrencia de la infección por *P. vivax* detectada por microscopía fue mayor que la detección por PCR. La mediana de tiempo de permanecer libre de recurrencia fue ~7 meses por PCR y ~12 meses por microscopía, es decir que el actual método del Programa Nacional de Malaria (basado solo en microscopía) no estaría detectando las recurrencias a tiempo. Asimismo, variables como comunidad de procedencia, grupo etario, y número de infecciones previas demostraron afectar la probabilidad de presentar una recurrencia, afectando así el riesgo de estos grupos a contraer malaria. Por último, se determinó que la proporción de infecciones submicroscópicas que se resolvieron o pasaron a ser indetectables fue mayor que la proporción de infecciones submicroscópicas que evolucionaron a una infección microscópica.

CAPÍTULO VII

RECOMENDACIONES Y LIMITACIONES

La metodología y enfoque de este estudio tuvo que ajustarse a los métodos y procedimientos de otros estudios que también evalúan las características de las infecciones recurrentes. Estudios que evalúan el tiempo de infección durante las recurrencias poseen un punto inicial igual o similar para todos los participantes, asegurando el tratamiento eficaz, por ende, la limpieza parasitológica. En nuestro estudio se agregaron tres criterios de inclusión que generaron que los individuos tengan distintos puntos iniciales a lo largo de la cohorte de tres años. Asimismo, de acuerdo a los procedimientos del Programa Nacional de Malaria al momento de iniciar la cohorte, solo los pacientes positivos a microscopía con presencia o ausencia de síntomas recibían tratamiento, por lo que la primera infección microscópica fue tomada como punto inicial en este estudio. Dentro del diagnóstico, es importante recalcar el límite de detección de las pruebas moleculares. Por ejemplo, infecciones por debajo de los 5 parásitos por uL no serían detectadas por la prueba diagnóstica de este estudio. Considerando que una gran proporción de las infecciones en la Amazonia son de muy baja parasitemia, es importante recalcar el sesgo de este estudio, por lo que se hace necesario el uso de una prueba molecular ultrasensible, previamente reportado en estudios cohorte. Otra limitación es la baja proporción de escenarios de evolución de infecciones submicroscópicas encontrados, lo que no permitió realizar análisis de factores asociados específicamente a ambos escenarios.

Por otro lado, con el fin de complementar el presente trabajo para una futura publicación se debe tomar en cuenta ciertas variables importantes en la transmisión de malaria. Así como se evaluó el tiempo de detección de las infecciones submicroscópicas, se debe evaluar las características de las infecciones recurrentes asintomáticas, ya que representan un gran porcentaje de las infecciones reportadas durante la cohorte. Otro factor a considerar sería la caracterización de los parásitos durante las recurrencias. A través de métodos de secuenciamiento, marcadores genéticos, y el riguroso seguimiento de este estudio, se podría determinar el aporte de cada uno de los tipos de recurrencias (relapso, recrudescencia y reinfección) en la dinámica de transmisión. A partir de ellos surgen preguntas como: ¿el haplotipo de la

primera infección es el mismo haplotipo de la recurrencia? ¿Como varían los haplotipos en el tiempo y según el tipo de infección? ¿Otros marcadores genéticos podrían estar relacionados a las recurrencias? Estas preguntas nos permitirían evaluar la dinámica y recambio de haplotipos durante tres años de seguimiento. Por último, se debería explorar la asociación de la carga parasitaria durante la primera infección y las recurrencias, con la evolución de las infecciones submicroscópicas y asintomáticas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. World Health Organization. World malaria report. Geneva Switz World Health Organ. 2020;1(1):300.
2. Cotter C, Sturrock HJ, Hsiang MS, Liu J, Phillips AA, Hwang J, et al. The changing epidemiology of malaria elimination: new strategies for new challenges. *The Lancet*. 2013 Sep;382(9895):900–11.
3. Ashley EA, Pyae Phyo A, Woodrow CJ. Malaria. *The Lancet*. 2018 Apr;391(10130):1608–21.
4. Eisele TP. Mass drug administration can be a valuable addition to the malaria elimination toolbox. *Malar J*. 2019 Dec;18(1):281.
5. Dayananda K, Achur R, Gowda Dc. Epidemiology, drug resistance, and pathophysiology of *Plasmodium vivax* malaria. *J Vector Borne Dis*. 2018;55(1):1.
6. Price RN, Commons RJ, Battle KE, Thriemer K, Mendis K. *Plasmodium vivax* in the Era of the Shrinking *P. falciparum* Map. *Trends Parasitol*. 2020 Jun;36(6):560–70.
7. Rosas-Aguirre A, Gamboa D, Manrique P, Conn JE, Moreno M, Lescano AG, et al. Epidemiology of *Plasmodium vivax* Malaria in Peru. *Am J Trop Med Hyg*. 2016 Dec 28;95(6 Suppl):133–44.
8. Griffing SM, Gamboa D, Udhayakumar V. The history of 20th century malaria control in Peru. *Malar J*. 2013 Dec;12(1):303.
9. Soto-Calle V, Rosas-Aguirre A, Llanos-Cuentas A, Abatih E, DeDeken R, Rodriguez H, et al. Spatio-temporal analysis of malaria incidence in the Peruvian Amazon Region between 2002 and 2013. *Sci Rep*. 2017 Feb;7(1):40350.
10. Dirección General de Epidemiología. Sala situacional para el Análisis de Situación de Salud [Internet]. Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades. 2018 [cited 2019 Apr 20]. p. 213. Available from: https://www.dge.gob.pe/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=647
11. Carrasco-Escobar G, Miranda-Alban J, Fernandez-Miñope C, Brouwer KC, Torres K, Calderon M, et al. High prevalence of very-low *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* parasitaemia carriers in the Peruvian Amazon: Insights into local and occupational mobility-related transmission. *Malar J*. 2017;16(1):1–15.
12. Rovira-Vallbona E, Contreras-Mancilla JJ, Ramirez R, Guzmán-Guzmán M, Carrasco-Escobar G, Llanos-Cuentas A, et al. Predominance of asymptomatic and sub-microscopic infections characterizes the *Plasmodium* gametocyte reservoir in the Peruvian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(7):1–18.
13. Delgado-Ratto C, Gamboa D, Soto-Calle VE, Van den Eede P, Torres E, Sánchez-Martínez L, et al. Population Genetics of *Plasmodium vivax* in the Peruvian Amazon. Barry AE, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Jan 14;10(1):e0004376.
14. Manrique P, Miranda-Alban J, Alarcon-Baldeon J, Ramirez R, Carrasco-Escobar G, Herrera H, et al. Microsatellite analysis reveals connectivity among geographically distant

- transmission zones of *Plasmodium vivax* in the Peruvian Amazon: A critical barrier to regional malaria elimination. van Schalkwyk DA, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2019 Nov 11;13(11):e0007876.
15. Delgado-Ratto C, Soto-Calle VE, Van den Eede P, Gamboa D, Rosas A, Abatih EN, 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. 2014 Dec;13(1):8.
 16. Carrasco-Escobar G, Fornace K, Wong D, Padilla-Huamantínco PG, Saldaña-Lopez JA, Castillo-Meza OE, et al. Open-Source 3D Printable GPS Tracker to Characterize the Role of Human Population Movement on Malaria Epidemiology in River Networks: A Proof-of-Concept Study in the Peruvian Amazon. Front Public Health. 2020 Sep 24;8:526468.
 17. Carrasco-Escobar G, Castro MC, Barboza JL, Ruiz-Cabrejos J, Llanos-Cuentas A, Vinetz JM, et al. Use of open mobile mapping tool to assess human mobility traceability in rural offline populations with contrasting malaria dynamics. PeerJ. 2019 Jan 22;7:e6298.
 18. Cowman AF, Healer J, Marapana D, Marsh K. Malaria: Biology and Disease. Cell. 2016 Oct;167(3):610–24.
 19. Gazzinelli RT, Kalantari P, Fitzgerald KA, Golenbock DT. Innate sensing of malaria parasites. Nat Rev Immunol. 2014 Nov;14(11):744–57.
 20. Adams JH, Mueller I. The Biology of *Plasmodium vivax*. Cold Spring Harb Perspect Med. 2017 Sep;7(9):a025585.
 21. Kori L, Valecha N, Anvikar A. Insights into the early liver stage biology of *Plasmodium*. J Vector Borne Dis. 2018;55(1):9.
 22. Meibalan E, Marti M. Biology of Malaria Transmission. Cold Spring Harb Perspect Med. 2017 Mar;7(3):a025452.
 23. World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria. Geneva: World health organization; 2015.
 24. Price RN, Tjitra E, Guerra CA, Yeung S, White NJ, Anstey NM. Vivax Malaria: Neglected and Not Benign. Am J Trop Med Hyg. 2007 Dec 1;77(6_Suppl):79–87.
 25. Grietens KP, Soto V, Erhart A, Ribera JM, Toomer E, Tenorio A, et al. Adherence to 7-Day Primaquine Treatment for the Radical Cure of *P. vivax* in the Peruvian Amazon. Am J Trop Med Hyg. 2010 Jun 1;82(6):1017–23.
 26. Lin JT, Saunders DL, Meshnick SR. The role of submicroscopic parasitemia in malaria transmission: what is the evidence? Trends Parasitol. 2014 Apr;30(4):183–90.
 27. Baird JK, Valecha N, Duparc S, White NJ, Price RN. Diagnosis and Treatment of *Plasmodium vivax* Malaria. Am J Trop Med Hyg. 2016 Dec 28;95(6 Suppl):35–51.
 28. The malERA Refresh Consultative Panel on Characterising the Reservoir and Measuring Transmission. malERA: An updated research agenda for characterising the reservoir and measuring transmission in malaria elimination and eradication. PLOS Med. 2017 Nov 30;14(11):e1002452.

29. Jiram AI, Ooi CH, Rubio JM, Hisam S, Karnan G, Sukor NM, et al. Evidence of asymptomatic submicroscopic malaria in low transmission areas in Belaga district, Kapit division, Sarawak, Malaysia. *Malar J.* 2019 Dec;18(1):156.
30. Adu B, Issahaque Q, Sarkodie-Addo T, Kumordjie S, Kyei-Baafour E, Sinclear CK, et al. Microscopic and Submicroscopic Asymptomatic *Plasmodium falciparum* Infections in Ghanaian Children and Protection against Febrile Malaria. Saeij JPJ, editor. *Infect Immun* [Internet]. 2020 Sep 18 [cited 2021 Jul 29];88(10). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/IAI.00125-20>
31. Baum E, Sattabongkot J, Sirichaisinthop J, Kiattibutr K, Jain A, Taghavian O, et al. Common asymptomatic and submicroscopic malaria infections in Western Thailand revealed in longitudinal molecular and serological studies: a challenge to malaria elimination. *Malar J.* 2016 Dec;15(1):333.
32. Tripura R, Peto TJ, Veugen CC, Nguon C, Davoeung C, James N, et al. Submicroscopic *Plasmodium* prevalence in relation to malaria incidence in 20 villages in western Cambodia. *Malar J.* 2017 Dec;16(1):56.
33. Kobayashi T, Kanyangarara M, Laban NM, Phiri M, Hamapumbu H, Searle KM, et al. Characteristics of Subpatent Malaria in a Pre-Elimination Setting in Southern Zambia. *Am J Trop Med Hyg.* 2019 Feb 6;100(2):280–6.
34. Hawash Y, Ismail K, Alsharif K, Alsanie W. Malaria Prevalence in a Low Transmission Area, Jazan District of Southwestern Saudi Arabia. *Korean J Parasitol.* 2019 Jun 30;57(3):233–42.
35. Barbosa S, Gozze AB, Lima NF, Batista CL, Bastos M da S, Nicolete VC, et al. Epidemiology of Disappearing *Plasmodium vivax* Malaria: A Case Study in Rural Amazonia. Rodrigues MM, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014 Aug 28;8(8):e3109.
36. Rosas-Aguirre A, Guzman-Guzman M, Gamboa D, Chuquiyauri R, Ramirez R, Manrique P, et al. Micro-heterogeneity of malaria transmission in the Peruvian Amazon: a baseline assessment underlying a population-based cohort study. *Malar J.* 2017 Dec;16(1):312.
37. Moreira CM, Abo-Shehada M, Price RN, Drakeley CJ. A systematic review of sub-microscopic *Plasmodium vivax* infection. *Malar J.* 2015 Dec;14(1):360.
38. Rosas-Aguirre A, Guzman-Guzman M, Chuquiyauri R, Moreno M, Manrique P, Ramirez R, et al. Temporal and Microspatial Heterogeneity in Transmission Dynamics of Coendemic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* in Two Rural Cohort Populations in the Peruvian Amazon. *J Infect Dis.* 2021 Apr 23;223(8):1466–77.
39. Sattabongkot J, Suansomjit C, Nguitragool W, Sirichaisinthop J, Warit S, Tiensuwan M, et al. Prevalence of asymptomatic *Plasmodium* infections with sub-microscopic parasite densities in the northwestern border of Thailand: a potential threat to malaria elimination. *Malar J.* 2018 Dec;17(1):329.
40. Osoga J, Waitumbi J, Guyah B, Sande J, Arima C, Ayaya M, et al. Comparative evaluation of fluorescent in situ hybridization and Giemsa microscopy with quantitative real-time PCR technique in detecting malaria parasites in a holoendemic region of Kenya. *Malar J.* 2017 Dec;16(1):297.

41. Cook J, Aydin-Schmidt B, González IJ, Bell D, Edlund E, Nassor MH, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for point-of-care detection of asymptomatic low-density malaria parasite carriers in Zanzibar. *Malar J.* 2015 Dec;14(1):43.
42. Morris U, Aydin-Schmidt B. Performance and Application of Commercially Available Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Kits in Malaria Endemic and Non-Endemic Settings. *Diagnostics.* 2021 Feb 18;11(2):336.
43. Gachugia J, Chebore W, Otieno K, Ngugi CW, Godana A, Kariuki S. Evaluation of the colorimetric malachite green loop-mediated isothermal amplification (MG-LAMP) assay for the detection of malaria species at two different health facilities in a malaria endemic area of western Kenya. *Malar J.* 2020 Dec;19(1):329.
44. Nolasco O, Infante B, Contreras-Mancilla J, Incardona S, Ding XC, Gamboa D, et al. Diagnosis of *Plasmodium vivax* by Loop-Mediated Isothermal Amplification in Febrile Patient Samples from Loreto, Perú. *Am J Trop Med Hyg.* 2020 Oct 7;103(4):1549–52.
45. Nolasco O, Montoya J, Rosales Rosas AL, Barrientos S, Rosanas-Urgell A, Gamboa D. Multicopy targets for *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* detection by colorimetric LAMP. *Malar J.* 2021 Dec;20(1):225.
46. World Health Organization. Malaria terminology. World Health Organization. 2019;1(1):38.
47. Van den Eede P, Soto-Calle VE, Delgado C, Gamboa D, Grande T, Rodriguez H, et al. *Plasmodium vivax* Sub-Patent Infections after Radical Treatment Are Common in Peruvian Patients: Results of a 1-Year Prospective Cohort Study. Gruner AC, editor. *PLoS ONE.* 2011 Jan 28;6(1):e16257.
48. Llanos-Cuentas A, Lacerda MV, Rueangweerayut R, Krudsood S, Gupta SK, Kochar SK, et al. Tafenoquine plus chloroquine for the treatment and relapse prevention of *Plasmodium vivax* malaria (DETECTIVE): a multicentre, double-blind, randomised, phase 2b dose-selection study. *The Lancet.* 2014 Mar;383(9922):1049–58.
49. Durand S, Cabezas C, Lescano AG, Galvez M, Gutierrez S, Arrospide N, 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.* 2014 Jul 2;91(1):18–26.
50. Llanos-Cuentas A, Lacerda MVG, Hien TT, Vélez ID, Namaik-larp C, Chu CS, et al. Tafenoquine versus Primaquine to Prevent Relapse of *Plasmodium vivax* Malaria. *N Engl J Med.* 2019 Jan 17;380(3):229–41.
51. White NJ, Imwong M. Relapse. In: *Advances in Parasitology* [Internet]. Elsevier; 2012 [cited 2021 Jun 11]. p. 113–50. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123979001000025>
52. White MT, Karl S, Koepfli C, Longley RJ, Hofmann NE, Wampfler R, et al. *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infection dynamics: re-infections, recrudescences and relapses. *Malar J.* 2018 Dec;17(1):170.
53. Delgado-Ratto C. Exploring the population genetics and transmission dynamics of *Plasmodium vivax* and its influence on the epidemiology of malaria in the Peruvian Amazon. [Antwerp]: University of Antwerp; 2019.

54. Silvino ACR, Costa GL, Araújo FCF de, Ascher DB, Pires DEV, Fontes CJF, et al. Variation in Human Cytochrome P-450 Drug-Metabolism Genes: A Gateway to the Understanding of Plasmodium vivax Relapses. Renia L, editor. PLOS ONE. 2016 Jul 28;11(7):e0160172.
55. St Jean PL, Xue Z, Carter N, Koh GCKW, Duparc S, Taylor M, et al. Tafenoquine treatment of Plasmodium vivax malaria: suggestive evidence that CYP2D6 reduced metabolism is not associated with relapse in the Phase 2b DETECTIVE trial. Malar J. 2016 Dec;15(1):97.
56. Chu CS, White NJ. Management of relapsing Plasmodium vivax malaria. Expert Rev Anti Infect Ther. 2016 Oct 2;14(10):885–900.
57. Weijer C. Another Tuskegee? Am J Trop Med Hyg. 1999 Jul 1;61(1_Supplement):1–3.
58. O’leary PA, Welsh AL. Treatment Of Neurosyphilis With Malaria: Observations On Nine Hundred And Eighty-Four Cases In The Last Nine Years. J Am Med Assoc. 1933 Aug 12;101(7):498–501.
59. Chernin E. The Malariatherapy of Neurosyphilis. J Parasitol. 1984 Oct;70(5):611.
60. Collins WE, Jeffery GM. A Retrospective Examination of the Patterns of Recrudescence in Patients Infected with Plasmodium Falciparum. Am J Trop Med Hyg. 1999 Jul 1;61(1_Supplement):44–8.
61. Jeffery GM, Collins WE. A Retrospective Examination of Sporozoite- and Trophozoite-Induced Infections with Plasmodium Falciparum in Patients Previously Infected with Heterologous Species of Plasmodium: Effect on Development of Parasitologic and Clinical Immunity. Am J Trop Med Hyg. 1999 Jul 1;61(1_Supplement):36–43.
62. Ashley EA, White NJ. The duration of Plasmodium falciparum infections. Malar J. 2014 Dec;13(1):500.
63. Felger I, Maire M, Bretscher MT, Falk N, Tiaden A, Sama W, et al. The Dynamics of Natural Plasmodium falciparum Infections. Gosling RD, editor. PLoS ONE. 2012 Sep 18;7(9):e45542.
64. Pham TV, Nguyen HV, Aguirre AR, Nguyen VV, A. Cleves M, Nguyen XX, et al. Plasmodium vivax morbidity after radical cure: A cohort study in Central Vietnam. Ashley EA, editor. PLOS Med. 2019 May 17;16(5):e1002784.
65. Nguyen T-N, von Seidlein L, Nguyen T-V, Truong P-N, Hung SD, Pham H-T, et al. The persistence and oscillations of submicroscopic Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax infections over time in Vietnam: an open cohort study. Lancet Infect Dis. 2018 May;18(5):565–72.
66. Tripura R, Peto TJ, Chalk J, Lee SJ, Sirithiranont P, Nguon C, et al. Persistent Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax infections in a western Cambodian population: implications for prevention, treatment and elimination strategies. Malar J. 2016 Dec;15(1):181.
67. Daher A, Silva JCAL, Stevens A, Marchesini P, Fontes CJ, Ter Kuile FO, et al. Evaluation of Plasmodium vivax malaria recurrence in Brazil. Malar J. 2019 Dec;18(1):18.
68. Zuluaga-Idárraga L, Blair S, Akinyi Okoth S, Udhayakumar V, Marcet PL, Escalante AA, et al. Prospective Study of Plasmodium vivax Malaria Recurrence after Radical Treatment

- with a Chloroquine-Primaquine Standard Regimen in Turbo, Colombia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016 Aug;60(8):4610–9.
69. Lawpoolsri S, Sattabongkot J, Sirichaisinthop J, Cui L, Kiattibutr K, Rachaphaew N, et al. Epidemiological profiles of recurrent malaria episodes in an endemic area along the Thailand-Myanmar border: a prospective cohort study. *Malar J.* 2019 Dec;18(1):124.
 70. Doolan DL, Dobaño C, Baird JK. Acquired Immunity to Malaria. *Clin Microbiol Rev.* 2009 Jan;22(1):13–36.
 71. Clark EH, Silva CJ, Weiss GE, Li S, Padilla C, Crompton PD, et al. *Plasmodium falciparum* Malaria in the Peruvian Amazon, a Region of Low Transmission, Is Associated with Immunologic Memory. Adams JH, editor. *Infect Immun.* 2012 Apr;80(4):1583–92.
 72. Villasis E, Garro K, Rosas-Aguirre A, Rodriguez P, Rosado J, Gave A, et al. PvMSP8 as a Novel *Plasmodium vivax* Malaria Sero-Marker for the Peruvian Amazon. *Pathogens.* 2021 Mar 2;10(3):282.
 73. Teklehaimanot and Paola Mejia A. Malaria and Poverty. *Ann N Y Acad Sci.* 2008 Jul 25;1136(1):32–7.
 74. Mueller I, Galinski MR, Tsuboi T, Arevalo-Herrera M, Collins WE, King CL. Natural Acquisition of Immunity to *Plasmodium vivax*. In: *Advances in Parasitology* [Internet]. Elsevier; 2013 [cited 2021 Aug 3]. p. 77–131. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124078260000035>
 75. Perez J. Factores asociados a la evolución de infecciones subpatentes de malaria en la Amazonía peruana. 2020 [cited 2021 Aug 4]; Available from: <https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/8421>
 76. Slater HC, Ross A, Felger I, Hofmann NE, Robinson L, Cook J, et al. The temporal dynamics and infectiousness of subpatent *Plasmodium falciparum* infections in relation to parasite density. *Nat Commun.* 2019 Dec;10(1):1433.
 77. Krogstad DJ, Koita OA, Diallo M, Gerone JL, Poudiougou B, Diakité M, et al. Molecular incidence and clearance of *Plasmodium falciparum* infection. *Malar J.* 2015 Dec;14(1):415.
 78. Bekessy A, Molineaux L, Storey J. Estimation of incidence and recovery rates of *Plasmodium falciparum* parasitaemia from longitudinal data. *Bull World Health Organ.* 1976;54(6):685–93.
 79. Okell LC, Bousema T, Griffin JT, Ouédraogo AL, Ghani AC, Drakeley CJ. Factors determining the occurrence of submicroscopic malaria infections and their relevance for control. *Nat Commun.* 2012 Jan;3(1):1237.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla S1. Número de personas e infecciones en riesgo de permanecer libre de recurrencias detectado por microscopía y PCR según la comunidad, el grupo etario, sexo, número de episodios previos de malaria y ocupación.

Comunidad													
Número de personas en riesgo	Tiempo (días)												
	0	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360
Detección por microscopía													
Cahuide	175	167	157	130	112	101	94	88	86	84	84	83	53
Lupuna	421	418	404	347	291	257	219	201	181	162	145	131	68
Detección por PCR													
Cahuide	175	171	154	131	111	102	95	83	82	74	62	58	36
Lupuna	421	416	395	331	285	244	207	186	158	135	111	91	45
Grupo etario													
Numero de infecciones en riesgo	Tiempo (días)												
	0	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360
Detección por microscopía													
≤ 15 años	296	290	271	224	180	148	124	114	103	93	75	58	24
> 15 años	300	297	283	223	176	155	129	110	97	90	79	66	31
Detección por PCR													
≤ 15 años	296	293	273	238	207	174	152	143	125	109	91	76	44
> 15 años	300	294	276	224	189	172	150	126	115	100	82	73	37
Episodios de malaria por <i>Plasmodium vivax</i> en su vida													
Numero de infecciones en riesgo	Tiempo (días)												
	0	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360
Detección por microscopía													
0	195	189	179	154	124	104	90	85	76	70	64	59	34
1	127	124	119	99	85	79	65	59	54	52	48	47	23
2 - 3	149	148	143	125	105	91	83	76	72	65	63	58	32
≥ 4	125	124	120	99	89	84	75	69	65	59	54	50	32
Detección por PCR													
0	195	192	179	157	136	114	100	94	83	72	61	55	27
1	127	126	116	103	84	78	68	59	49	43	35	29	17
2 - 3	149	146	137	109	95	84	75	68	64	56	45	36	19
≥ 4	125	123	117	93	81	70	59	48	44	38	32	29	18
Sexo													
Numero de infecciones en riesgo	Tiempo (días)												
	0	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360
Detección por microscopía													
Mujer	322	317	302	258	217	195	164	156	143	132	123	115	67
Hombre	274	268	259	219	186	163	149	133	124	114	106	99	54
Detección por PCR													
Mujer	322	319	295	250	207	178	155	139	121	107	86	77	45
Hombre	274	268	254	212	189	168	147	130	119	102	87	72	36
Ocupación al aire libre (leñador, pescador o agricultor)													
Numero de infecciones en riesgo	Tiempo (días)												
	0	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360
Detección por microscopía													
Si	104	102	100	90	80	74	68	66	63	58	56	52	28
No	492	483	461	387	323	284	245	223	204	188	173	162	93
Detección por PCR													
Si	104	103	98	81	71	66	59	49	45	38	30	27	9
No	492	484	451	381	325	280	243	220	195	171	143	122	72
Episodios de malaria por <i>Plasmodium vivax</i> en el último año													
Numero de infecciones en	Tiempo (días)												

riesgo	0	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360
Detección por microscopía													
0	433	425	411	357	299	261	223	207	188	168	154	143	75
1	104	102	98	78	65	63	58	55	55	54	52	49	31
2 - 3	48	48	42	37	34	30	29	24	21	21	20	19	14
≥ 4	11	10	10	5	5	4	3	3	3	3	3	3	1
Detección por PCR													
0	433	428	407	344	292	252	216	195	171	146	123	108	50
1	104	103	95	78	66	59	54	49	46	41	32	25	20
2 - 3	48	46	37	33	31	29	26	21	19	18	14	12	8
≥ 4	11	10	10	7	7	6	6	4	4	4	4	4	3

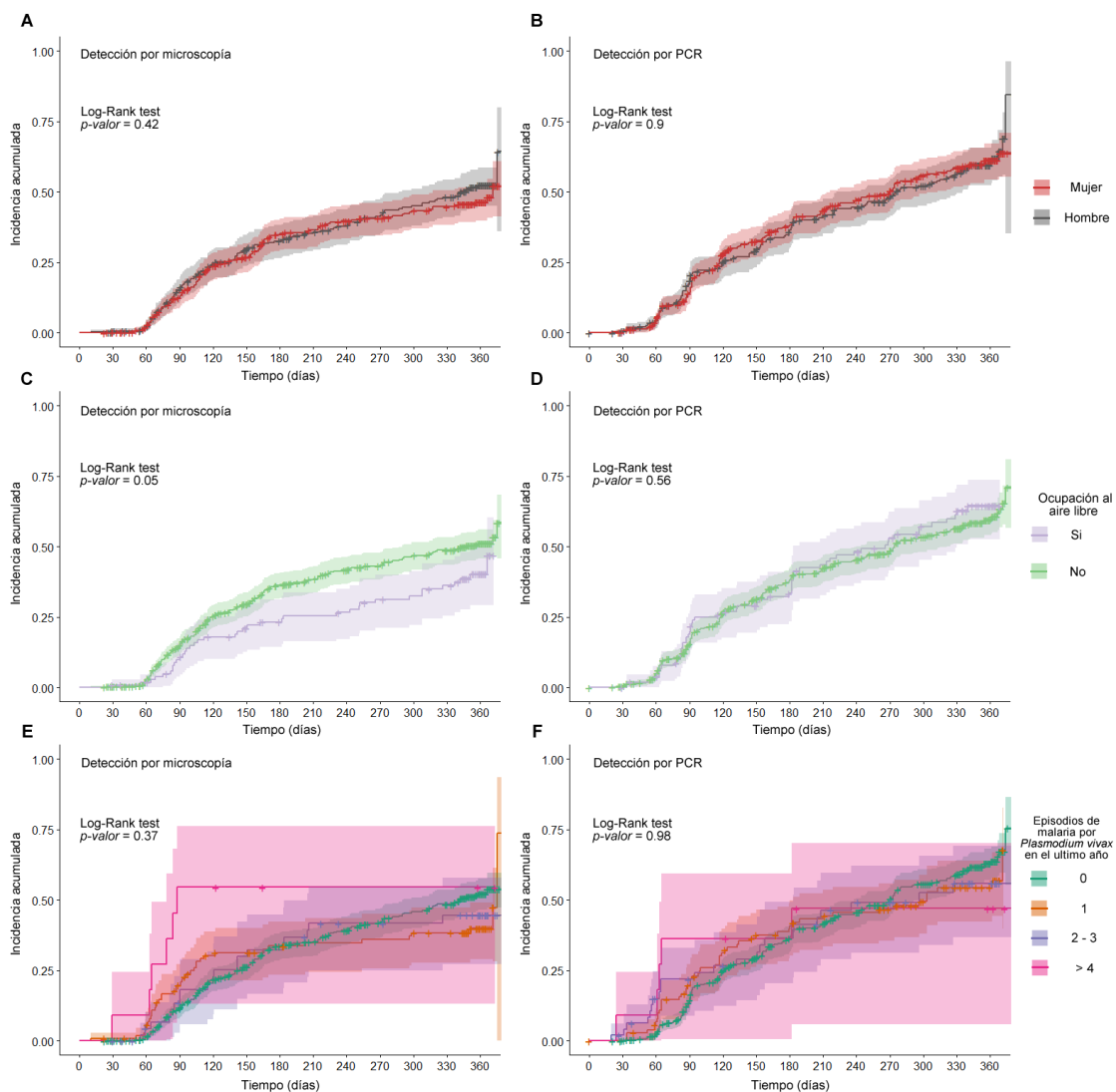


Figura S1. Riesgo acumulado de presentar infecciones recurrentes por *Plasmodium vivax* según el sexo a través de la detección por microscopía (A), y la detección por PCR (B). Riesgo acumulado de presentar infecciones recurrentes por *Plasmodium vivax* según el tipo de ocupación a través de la detección por microscopía (C), y la detección por PCR (D). Riesgo acumulado de presentar infecciones recurrentes por *Plasmodium vivax* según el número de episodios previos de malaria en el último año a través de la detección por microscopía (E), y la detección por PCR (F). La comparación entre curvas de supervivencia se realizó con el test Log-Rank.

Tabla S2. Análisis univariados de factores de riesgo para la primera recurrencia y para todas las recurrencias según la detección por PCR y por microscopía

Método de detección	Microscopia						PCR					
	Análisis Univariados de la primera recurrencia			Análisis Univariados de todas las recurrencias			Análisis Univariados de la primera recurrencia			Análisis Univariados de todas las recurrencias		
	HR	95% CI	valor de p	HR	95% CI	valor de p	HR	95% CI	valor de p	HR	95% CI	valor de p
Comunidad												
Cahuide	1			1			1			1		
Lupuna	1.36	0.932 - 1.98	0.111	1.54	1.14 - 2.09	0.005	1.51	1.07 - 2.13	0.0182	1.67	1.26 - 2.2	0.0003
Sexo												
Mujer	1			1			1			1		
Hombre	0.854	0.606 - 1.2	0.368	0.903	0.705 - 1.16	0.423	1.09	0.802 - 1.49	0.576	1.01	0.809 - 1.27	0.903
Edad												
≤ 15 años	1			1			1			1		
> 15 años	0.668	0.474 - 0.942	0.0213	0.751	0.585 - 0.963	0.0242	1.45	1.07 - 1.98	0.0179	1.28	1.02 - 1.61	0.0332
Ocupación al aire libre (leñador, pescador o agricultor)												
Si	1			1			1			1		
No	0.643	0.399 - 1.04	0.0693	0.708	0.501 - 1.00	0.0508	1.36	0.948 - 1.95	0.0954	1.09	0.818 - 1.45	0.555
Episodios de malaria por <i>Plasmodium vivax</i> en su vida												
0 - 1	1			1			1			1		
≥ 2	1	0.712 - 1.41	0.984	0.977	0.762 - 1.25	0.855	1.64	1.21 - 2.23	0.0015	1.35	1.07 - 1.69	0.00992
Episodios de malaria por <i>Plasmodium vivax</i> en el último año												
0 - 1	1			1			1			1		
≥ 2	1.05	0.591 - 1.86	0.873	1.05	0.692 - 1.58	0.83	1.12	0.674 - 1.84	0.671	0.953	0.646 - 1.41	0.81
Hacinamiento (>3 personas/habitación)												
No	1			1			1			1		
Si	0.925	0.656 - 1.3	0.656	0.952	0.742 - 1.22	0.697	0.94	0.693 - 1.28	0.692	1.02	0.813 - 1.28	0.867
Presencia de pared de madera												
No	1			1			1			1		
Si	0.917	0.6 - 1.4	0.688	1.05	0.759 - 1.46	0.753	0.98	0.672 - 1.43	0.915	0.942	0.702 - 1.26	0.692
Presencia de piso de tierra												
No	1			1			1			1		
Si	1.12	0.789 - 1.6	0.517	0.988	0.767 - 1.27	0.925	1.04	0.762 - 1.43	0.792	1.09	0.862 - 1.37	0.477
Cobertura de los mosquiteros (mosquiteros/camas), %.												
<80	1			1			1			1		
≥80	1.31	0.483 - 3.54	0.598	1.49	0.613 - 3.6	0.381	0.866	0.354 - 2.12	0.753	1.34	0.596 - 3.00	0.481
Mosquiteros de material Olyset/Permanet												
No	1			1			1			1		
Si	0.986	0.659 - 1.48	0.946	1.35	0.973 - 1.87	0.0724	1.25	0.854 - 1.83	0.25	1.42	1.05 - 1.92	0.0232