



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Facultad de Ciencias y Filosofía

“Alberto Cazorla Talleri”

**FACTORES ASOCIADOS A RECURRENCIAS
ASINTOMÁTICAS POR INFECCIÓN DE *Plasmodium vivax*
LUEGO DEL TRATAMIENTO CURA RADICAL EN
COMUNIDADES DE LA AMAZONÍA PERUANA**

Tesis para optar el Título de Licenciado en Biología

Autor: Caroline Jasmine Abanto Alvarez

Asesor: Dr. Jorge Enrique Rodriguez Bailon
Co-asesor: Dr. Richard Christopher Delgado Ratto

Lima, Perú

2022

Asesor:

JORGE ENRIQUE RODRIGUEZ BAILON, MSc., PhD.

Departamento de Ciencias Celulares y Moleculares,
Facultad de Ciencias y Filosofía
Universidad Peruana Cayetano Heredia

Co-asesor:

RICHARD CHRISTOPHER DELGADO RATTO, MSc., PhD.

Malaria Research Group (MaRCh),
Instituto de Salud Global,
Facultad de Medicina
Universidad de Amberes, Bélgica

Laboratorio de Malaria
Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt
Universidad Peruana Cayetano Heredia

DEDICATORIA

A mi amado hermano Giovanni que siempre confió en mí y que ahora en el cielo comparte conmigo este logro.

A mis padres, Walter y Judith, que están convencidos que tienen a la hija más inteligente. Los amo demasiado.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todo el equipo del Laboratorio de Malaria - UPCH que me ofreció un ambiente hermoso para crecer y educarme. Especialmente a mi asesor el Dr. Christopher Delgado-Ratto que hizo que este proyecto sea un aprendizaje constante y a la Dra. Dionicia Gamboa que mediante su exigencia me motivo a no rendirme. También agradezco a Luis Cabrera que le dedico su tiempo a este proyecto y que esto fue valioso para mí. Agradezco también a mis mejores amigos Stefano y Joaquín, ellos han sido sin duda un regalo de Dios en mi vida haciendo que todo este proceso de estudiar Biología y meterme en ciencia valga realmente la pena. También expongo mis agradecimientos a mi querido asesor el Dr. Jorge Rodríguez quien me ha apoyado y animado en muchas ocasiones difíciles a seguir adelante. Agradezco a mi familia; a mi bella hermana Stefany, solo ella sabe que tan difícil ha sido todo este proceso y a mis padres que a pesar de los problemas nunca dejaron de confiar en mí. Finalmente agradezco a Dios quien es el principal autor de todo esto, me guio por los caminos correctos y está permitiendo que mis sueños sean sucesos reales en mi vida.

FACTORES ASOCIADOS A RECURRENCIAS ASINTOMÁTICAS POR INFECCIÓN DE Plasmodium vivax LUEGO DEL TRATAMIENTO CURA RADICAL EN COMUNIDADES DE LA AMAZONÍA PERUANA

INFORME DE ORIGINALIDAD

5 %	5 %	1 %	1 %
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	icpvr-2022.p.asnevents.com.au Fuente de Internet	1 %
2	repositorium.uminho.pt Fuente de Internet	<1 %
3	hdl.handle.net Fuente de Internet	<1 %
4	www.frontiersin.org Fuente de Internet	<1 %
5	pubmed.ncbi.nlm.nih.gov Fuente de Internet	<1 %
6	reliefweb.int Fuente de Internet	<1 %
7	aunilo.uum.edu.my Fuente de Internet	<1 %
8	worldwidescience.org Fuente de Internet	<1 %

ÍNDICE

I.	RESUMEN.....	1
II.	ABSTRACT.....	2
III.	INTRODUCCIÓN	3
III.1	Antecedentes:	3
III.1.1	Biología del Parasito: ciclo de vida de <i>Plasmodium vivax</i>	3
III.1.1.1	Etapa en el humano: Infección pre-eritrocítica	3
III.1.1.2	Etapa en el humano: Fase eritrocítica	4
III.1.1.3	Etapa en el mosquito: Fase esporogénica.....	4
III.1.2	Desafíos para la eliminación de la malaria en el Perú	6
III.1.2.1	Implicaciones en la biología del parasito:	6
A.	Ciclo de vida en el mosquito:.....	6
B.	Ciclo de vida en el humano:.....	6
III.1.2.2	Estrategias de control:.....	7
A.	Control del vector:	7
B.	Diagnóstico:.....	7
C.	Tratamiento:.....	8
III.1.3	Situación de la Malaria en el Perú: perspectivas del pasado y la actualidad	9
III.1.4	Las infecciones asintomáticas: definición, características y problemática	11
III.1.4.1	Definición y mecanismo inmunológico:	11
III.1.4.2	Problemática en el Perú:	12
III.1.5	Recurrencias por <i>Plasmodium vivax</i> y su relación con la malaria residual	14
III.1.6	Epidemiología molecular de las recurrencias: dinámica de cambio en el aspecto genético y sintomatológico	16
III.1.7	Factores asociados a recurrencias: importancia en la epidemiología de la malaria	18
III.2	Planteamiento del Problema.....	21
III.3	Justificación del estudio	22
IV.	HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	23
IV.1	Pregunta de investigación:	23
IV.2	Hipótesis:	23
IV.3	Objetivo general:.....	23
IV.4	Objetivos específicos:	23
V.	MÉTODOS	25
V.1	Conceptos y clasificaciones:	25
V.1.1	Infecciones asintomáticas:	25
V.1.2	Multiplicidad de infección (MOI):	25
V.1.3	Comparación de genotipos: D0 vs recurrencias (variabilidad genética).....	25
V.1.4	Densidad parasitaria y otros conceptos:.....	26

V.2	Áreas de estudio:	26
V.3	Diseño del estudio:	28
V.4	Análisis estadísticos:	29
V.5	Consideraciones Éticas:	31
VI.	RESULTADOS	32
VI.1	Características basales de la población y sus infecciones recurrentes.	32
VI.2	Caracterización de las recurrencias según la presencia de síntomas.	34
VI.2.1	Características de la infección inicial (D0) de cada participante:	34
VI.2.2	Características de las recurrencias:	36
VI.2.3	Distribución de las recurrencias asintomáticas y sintomáticas por área de estudio: ...	38
VI.3	Evolución de la presencia de síntomas en las infecciones recurrentes por <i>Plasmodium vivax</i> :	39
VI.3.1	Análisis de riesgo según presencia de síntomas:	39
VI.3.2	Evaluación del cambio en la presencia de síntomas a través del tiempo.	40
VI.3.3	Evaluación de la densidad de incidencia de los escenarios de cambio en el estatus sintomatológico (sintomático/asintomático).	41
VI.4	Evaluación de la evolución genética de las recurrencias a nivel intra-hospedero..	46
VI.4.1	Evaluación del cambio en la multiplicidad de infección y la variabilidad genética través del tiempo.	46
VI.4.2	Evaluación de la densidad de incidencia en los cambios de genotipos en los episodios recurrentes con el D0.	49
VI.5	Evaluación de los factores asociados a recurrencias asintomáticas y sintomáticas	51
VII.	DISCUSIÓN	60
VIII.	CONCLUSIONES	68
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
X.	MATERIAL SUPLEMENTARIO	80

LISTADO DE TABLAS

Tabla N°1: Revisión de los factores asociados a recurrencias en infecciones por <i>P. vivax</i>	18
Tabla N°2: Lista de los análisis realizados según cada objetivo específico.....	31
Tabla N°3: Características basales de los participantes del estudio agrupados por áreas de estudio. ...	32
Tabla N° 4: Número de participantes con recurrencias por <i>P. vivax</i> agrupados por áreas de estudio. .	34
Tabla N°5: Características de las infecciones detectadas previas al tratamiento (D0) agrupadas según la presencia de síntomas.	35
Tabla N°6: Características de las recurrencias por <i>P. vivax</i> agrupadas según presencia de síntomas ..	37
Tabla N°7: Proporción de las infecciones recurrentes asintomáticas y sintomáticas agrupadas según área de estudio.	38
Tabla N°8: Análisis univariado del riesgo de experimentar recurrencias de <i>P. vivax</i> utilizando el modelo Cox CP comparando entre infecciones asintomáticas y sintomáticas.	53
Tabla N° 9: Análisis univariado del riesgo para la última recurrencia utilizando el modelo Cox PH entre asintomáticas y sintomáticas.	54
Tabla N°10: Análisis de riesgo multivariado de las recurrencias utilizando el modelo Cox CP entre asintomáticos y sintomáticos	57
Tabla N°11: Análisis de riesgo multivariado para la última recurrencia utilizando el modelo Cox PH.	58
Anexo N°1: Tabla de comunidades por áreas de estudio.....	80
Anexo N°3: Numero y porcentaje de riesgo para que se den los eventos recurrentes según presencia de sintomatología a través del tiempo.	81
Anexo N°4: Análisis de factor de riesgo multivariado para la primera recurrencia utilizando el modelo Cox PH entre asintomáticas y sintomáticas.	82
Anexo N°7: Análisis de factor de riesgo multivariado para la aparición de una recurrencia utilizando el modelo Cox CP.....	84

LISTADO DE FIGURAS

Figura N°1: Ciclo biológico de <i>Plasmodium vivax</i>	5
Figura N°2: Número de casos de malaria reportados en el Perú desde 1994 al 2021	9
Figura N°3: Transmisión de la malaria según presencia de síntomas	13
Figura N°4: Ciclo de la recurrencia de <i>P. vivax</i> a nivel de la fase hepática en el hospedero	17
Figura N° 5: Mapa de las áreas de estudio.....	27
Figura N°6: Flujograma sobre la selección y caracterización de los individuos enrolados en los análisis	33
Figura N°7: Curvas de riesgo a infecciones asintomáticas y sintomáticas	40
Figura N° 8: Presencia de síntomas durante el estudio	42
Figura N° 9: Diagrama de los escenarios de evolución de las infecciones según presencia de síntomas.	43
Figura N° 10: Curva de supervivencia a cambios según presencia de síntomas.....	45
Figura N°11: Evolución en el tiempo de la Multiplicidad de infección (MOI) a través de las recurrencias.....	47
Figura N°12: Evolución en el tiempo de la variabilidad genética a través de las recurrencias.....	48
Figura N°13: Diagrama de los escenarios de evolución de las infecciones según variabilidad genética	50
Figura N°14: Curva de supervivencia para cambios según variabilidad genética	51
Figura N°15: Forest-plot de los cocientes de riesgo de las variables asociadas a las recurrencias asintomáticas y sintomáticas.....	56
Anexo N°2: Presencias de recurrencias asintomáticas y sintomáticas por área de estudio.....	81
Anexo N°5: Forest-plot multivariado de las recurrencias asintomáticas.....	83
Anexo N°6: Diagrama de los escenarios de evolución de las recurrencias según multiplicidad de infección.	83
Anexo N°8: Curvas de riesgo de Nelson – Aalen según multiplicidad de infección y variabilidad en los genotipos en episodios asintomáticos.....	85

I. RESUMEN

La malaria presenta una alta relevancia en nuestro país, ya que pesar de los avances realizados, aún es un problema persistente en la Amazonia Peruana, donde más del 80% de los casos son por *P. vivax*. Sin embargo, en los últimos años se ha experimentado una reducción significativa en el número de casos pasando al escenario actual de malaria residual con transmisión heterogénea. Escenario que se caracteriza por una alta ocurrencia de infecciones asintomáticas, las cuales contribuyen hasta en el 73% de la transmisión de la malaria en Perú. El presente estudio analizó la evolución intra-hospedera de los síntomas de malaria y los genotipos de *P. vivax* en infecciones recurrentes a través de un estudio longitudinal en 29 comunidades de la Amazonía peruana. Nuestro objetivo es proporcionar información sobre los factores asociados a recurrencias asintomáticas. Por lo tanto, se analizaron datos de una cohorte de 302 individuos con malaria por *P. vivax*, tratados con cloroquina más primaquina. Los cuales fueron sistemáticamente monitoreados hasta por 2 años. El 66% (198/302) de los participantes experimentaron al menos una recurrencia a lo largo del tiempo. De estos se llegó a registrar un total de 609 recurrencias, donde el 65% (398/609) fueron asintomáticas. Respecto a la evolución intra-hospedera, los participantes tuvieron un mayor riesgo de desarrollar recurrencias sintomáticas (log-rank $p < 0.001$) a lo largo del tiempo. Sin embargo, los individuos tienen la tendencia de volverse asintomáticos si previamente experimentaron infecciones sintomáticas. Por otro lado, experimentar una recurrencia con parásitos homólogos con la infección inicial y ser un individuo de 6 a 60 años se asociaron al riesgo de experimentar una recurrencia asintomática. En tanto, vivir en comunidades aisladas disminuía el riesgo a presentar estas infecciones. Se concluye que la aparición de recurrencias asintomáticas está asociada tanto a las características del huésped como del parásito. El conocimiento de estos factores puede ser relevante para el desarrollo de intervenciones más asertivas contra la malaria residual en las áreas de la Amazonía.

Palabras clave: Plasmodium vivax, recurrencias, Amazonia Peruana, estudio longitudinal, diversidad intra-hospedera.

II. ABSTRACT

Malaria has high relevance in our country. Despite progress, it is still a persistent problem in the Peruvian Amazon, where more than 80% of cases are due to *Plasmodium vivax*. However, in recent years, there has been a significant reduction in cases. This reflects a current scenario of residual malaria with heterogeneous transmission, characterized by the high occurrence of asymptomatic infections which contributes up to 73% of community malaria transmission in Peru. The present study analyzed the intra-host evolution of malaria symptoms and *Plasmodium vivax* genotypes in recurrent infections in a longitudinal study in 29 communities of the Peruvian Amazon. Our goal is to provide information on the factors associated with asymptomatic recurrences. To this aim, basic data on the parasite's individual, infection, and genotype (14 neutral microsatellites) were analyzed from a cohort of 302 individuals with malaria by *P. vivax*, treated with chloroquine + primaquine. Participants were also systematically monitored for up to 2 years. The 66% (198/302) of the participants experienced at least one recurrence over time. A total of 609 recurrences were reached, even having records of participants who experienced up to 11 recurrent episodes. Of the total recurrences, 65% (398/609) were asymptomatic. Regarding intra-host evolution, participants had an increased risk of developing episodes with symptoms (log-rank $p < 0.001$) over time. However, individuals tended to become asymptomatic if they previously experienced symptomatic infections. Experiencing a recurrence with homologous parasites to the initial infection, and being an individual aged 6 to 60 years were associated with experiencing an asymptomatic recurrence. In the other hand, living in isolated communities reduced the risk of developing these infections. We conclude that the appearance of asymptomatic recurrences is associated with both the characteristics of the host and the parasite. The knowledge of these factors would be relevant for the development of more assertive interventions against residual malaria in the areas of the Amazon.

Key words: Plasmodium vivax, recurrences, Peruvian Amazon, longitudinal study, intra-host diversity.

III. INTRODUCCIÓN

III.1 Antecedentes:

III.1.1 Biología del Parasito: ciclo de vida de *Plasmodium vivax*

El ciclo de vida de *Plasmodium vivax* presenta dos etapas principales: la primera se desarrolla dentro del ser humano y la segunda en los mosquitos del género *Anopheles*. Este parásito ingresa en el individuo mediante la picadura de un mosquito infectado. Dentro del hospedero humano, cumple su desarrollo asexual por medio de invasión celular, donde incrementa su volumen parasitario. Luego empieza un estadio de desarrollo de diferenciación sexual. Finalmente, su ciclo se completa dentro del mosquito dando inicio a otro ciclo por medio de la transmisión del parásito a otro individuo sano. A continuación se hará una descripción más detallada de cada etapa (Figura N°1) (1–3).

III.1.1.1 Etapa en el humano: Infección pre-eritrocítica

Este ciclo empieza con la picadura de un mosquito hembra del género *Anopheles* a un individuo humano. A través de la saliva ingresan los esporozoitos (estadio infectivo) (Figura 1.A). Algunos de estos esporozoitos atraviesan la piel, llegan al flujo sanguíneo, para luego alcanzar a las células hepáticas. En tanto, otros son absorbidos por las células linfáticas que son estimuladas por medio de la respuesta inmune del huésped (2). Aunque no se ha estudiado a detalle lo que sucede en este periodo, se estima que este proceso de invasión tiene una duración aproximada de 1 a 3 horas (2,4). Al llegar al hígado, los esporozoitos tienen contacto con la barrera sinusoidal que está compuestas específicamente por células endoteliales y de Kupffer. Para que los esporozoitos puedan enfrentar esta barrera, estos empiezan a segregar proteínas de reconocimiento como la proteína circumesporozoito (CSP), la proteína adhesiva relacionada a la trombospondina (TRAP) y la proteína heparina sulfato proteoglicano altamente sulfatado (HSPGs). Estas permiten que las células de Kupffer den el paso del parásito a través de la formación de vacuolas parasitóforas (4,5) .

Después del paso de los esporozoitos por la barrera sinusoidal, estos llegan a tener contacto con las células hepáticas (Figura 1.B). Dependiendo del nivel de sulfatación de las HSPGs, estos parásitos empiezan a invadir a los hepatocitos por medio de vacuolas parasitóforas (2). Dentro de estas vacuolas, el parásito empieza a alimentarse

de nutrientes extraídos del plasma de las células hepáticas, para continuar con su desarrollo. Los esporozoitos se transforman primero en trofozoítos hepáticos, y luego en esquizontes, los que producen la replicación meiótica para formar los merozoitos. La primera ruta de estos merozoitos se da a través de la liberación de miles de estos parásitos en el torrente sanguíneo, dando inicio a la fase eritrocítica. No obstante, existe otro estadio en su desarrollo, los hipnozoitos. Este estadio permanece en las células hepáticas en latencia durante periodos indeterminados de tiempo, para luego activarse y provocar relapsos en el hospedero. Este estadio es significativamente único para *Plasmodium vivax*, el cual le otorga facilidades en su transmisión (1,6). También hay registros de hipnozoitos en *Plasmodium ovale*, pero aún no son concluyentes (7,8).

III.1.1.2 Etapa en el humano: Fase eritrocítica

Por medio de la ruptura de los hepatocitos, se liberan los merozoitos (vesículas llenas de merozoitos), estas permiten el paso de los merozoitos al torrente sanguíneo. En *P. vivax* los merozoitos tienen una preferencia en la invasión de reticulocitos (eritrocitos inmaduros) los cuales sufren deformación al ser invadidos. Una vez dentro de la célula huésped, los merozoitos continúan su desarrollo, formándose los trofozoítos (forma de anillo) y luego los esquizontes. Estos esquizontes aumentan su tamaño, provocando una hinchazón en los glóbulos rojos, para luego fragmentarse y liberar de 16 a 24 merozoitos a partir de la ruptura de un reticulocito (Figura 1.C). Este proceso de maduración dura 48 horas y la liberación de los merozoitos al torrente sanguíneo coincide con los episodios de fiebre y malestar en los individuos infectados. Por otro lado, una porción de los merozoitos liberados en sangre empiezan su desarrollo sexual, hacia el estadio de gametocitos (1,6,9).

III.1.1.3 Etapa en el mosquito: Fase esporogónica

Los gametocitos se encuentran liberados en la sangre del hospedero para luego ser absorbidos por un mosquito a través de una nueva picadura. Estos ingresan hasta el intestino medio y allí completan su desarrollo sexual. Los gametocitos masculinos son denominados micro-gametocitos y los femeninos macro-gametocitos. Últimos estudios han determinado que el ácido xantucenico es un factor activador de gametocitos, que junto al cambio de pH y la temperatura, permite que ambos gametocitos inicien su ciclo sexual y formen un cigoto (Figura 1.D)(10). Este cigoto cambia a tener una forma alargada, convirtiéndose en un ooquineto. Esta forma le permite atravesar la membrana peritrófica y las células epiteliales, para establecerse

como ooquiste debajo de la lámina basal del intestino medio. El ooquiste completa su ciclo meiótico para luego replicarse a través de la mitosis, llegando a formar hasta 10 000 esporozoitos de un solo ooquiste. Los esporozoitos son liberados y estos migran hasta las glándulas salivales del mosquito, donde se mantienen en espera de una próxima inoculación a un nuevo individuo (Figura 1.E) (1,3,10).

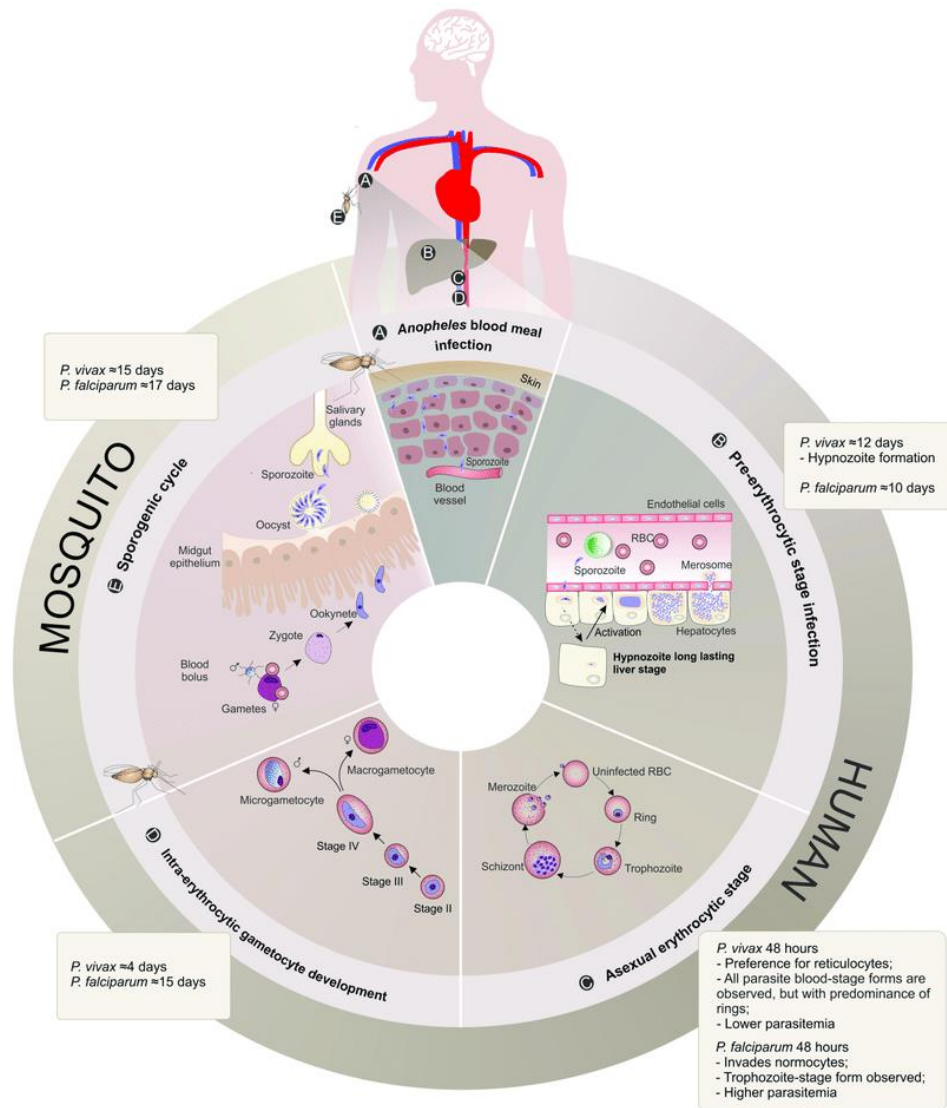


Figura N°1: Ciclo biológico de *Plasmodium vivax*

Ciclo de vida de *Plasmodium vivax*. El diagrama incluye una comparativa en los tiempos de cada fase entre *P. vivax* y *P. falciparum*. Diagrama extraído del trabajo de Bougard, 2018 (3).

III.1.2 Desafíos para la eliminación de la malaria en el Perú

III.1.2.1 Implicaciones en la biología del parásito:

A partir del complejo ciclo de vida que presenta *P. vivax*, se desarrollan particularidades que representan un reto para el control y eliminación de la malaria.

A. Ciclo de vida en el mosquito:

Existe una relación vital entre el mosquito y la temperatura. Las especies de *Anopheles*; pueden sobrevivir a temperaturas más templadas. Esto permite que su distribución en las áreas geográficas sea menos limitada. Además, *P. vivax* tiene la capacidad de desarrollarse en esporogonias a temperaturas más bajas en comparación a *Plasmodium falciparum*. En consecuencia, esta adaptación no solo favorece en el alcance geográfico del vector y del parásito, sino que también permite que la temporada de transmisión sea más larga.

Por otro lado, en zonas endémicas para *P. vivax*, existen vectores que prefieren alimentarse en espacios abiertos o al aire libre. Por lo tanto, las estrategias aplicadas entorno a los mosquiteros con insecticidas presentan menos eficacia y proveen una protección reducida (1,11).

B. Ciclo de vida en el humano:

Durante la etapa pre-eritrocítica, *P. vivax* presenta un estadio de latencia en el hígado (los hipnozoitos), que causa la aparición de episodios recurrentes o relapsos. Aún no existe un método de diagnóstico que pueda identificar la presencia de hipnozoitos en el hospedero. Debido a esto, no se puede realizar una vigilancia específica para estos pacientes. Esto beneficia a la transmisión del parásito y puede llegar a promover la reintroducción de la enfermedad en áreas ya tratadas. Además, la dificultad de diferenciar un relapso de una reinfección causa problemas al querer realizar ensayos de eficacia terapéutica (12).

A diferencia de *P. falciparum*, que puede llegar a invadir a cualquier tipo de glóbulo rojo, *P. vivax* tiene una preferencia en invadir solo reticulocitos. Esto dificulta su cultivo *in vitro* y limita su investigación, siendo otro desafío para el estudio y control del paludismo (2). Además, al ser estos reticulocitos un tipo de célula sanguínea en desarrollo o inmadura su constante destrucción promueve la anemia crónica en los individuos infectados. Esta preferencia también provoca que las parasitemias en

infecciones por *P. vivax* se caractericen por ser bajas, generando dificultades para su detección y subestimando su prevalencia, en especial en áreas de baja transmisión (13).

Finalmente, esta especie tiene la capacidad de desarrollar gametocitos de forma temprana durante la etapa eritrocítica, incluso antes de presentarse los síntomas en el hospedero. Esta capacidad confiere ventajas en la transmisión, ya que los gametocitos pueden continuar su desarrollo en un mosquito antes de ser eliminado por el tratamiento en el humano (14–16).

III.1.2.2 Estrategias de control:

A. Control del vector:

En consecuencia al desarrollo temprano de los gametocitos y la formación de hipnozoitos latentes, el individuo infectado se convierte en un reservorio del parásito (15,16). Esta condición promueve la transmisión del parásito y genera una urgencia en el uso de nuevas medidas para el control del vector. En la actualidad, se han desarrollado herramientas que permiten la protección a picaduras tanto en interiores como exteriores. Entre estas, se encuentran la aplicación conjunta de hamacas, ropa y redes tratadas con insecticidas (1,17). Por todo esto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) además de recomendar el uso tradicional de mosquiteros tratados, también pide que se incremente la vigilancia a los vectores, por medio de la identificación de sus focos de reproducción y zonas de riesgo, la vigilancia de mosquitos resistentes a los insecticidas y las campañas de educación en las comunidades afectadas sobre el control del vector (13,18).

B. Diagnóstico:

En la actualidad, existen muchos desafíos para garantizar un correcto diagnóstico para de la malaria por *P. vivax*: las bajas parasitemias, la aparición de síntomas que son comunes a otras infecciones y al arresto del parásito en otras zonas del organismo como el hígado, médula ósea y bazo (1). Para esto, la OMS recomienda el uso de microscopia y las Pruebas de Diagnóstico Rápido (PDR). Sin embargo, también existen alternativas de diagnóstico molecular (18).

En el Perú, la microscopia es la técnica más utilizada, esta puede llegar a tener una alta especificidad y sensibilidad, pero esto va a depender de la experiencia de los microscopistas (19,20). Sin embargo, muchas de las infecciones actualmente están por debajo del límite de la capacidad de detección de los analistas; diagnosticándose como

negativas según microscopia, a pesar de la presencia del parásito en el organismo. A estas infecciones se las denomina como submicroscópicas, presentando una incidencia anual del 68-74% de las infecciones registradas (20,21). Por otro lado, las PDR es una técnica que puede llegar a zonas más alejadas, sin la necesidad de infraestructura o de personal especializado, pero puede llegar a ser menos eficaz que la microscopia (1,18,19).

También se cuenta con las técnicas moleculares, que son las más sensibles y específicas. Estas llegan a detectar de 1- 5 parásitos/ul, enfrentando así el problema de las parasitemias bajas y las infecciones mixtas (19). Los procedimientos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) convencional y PCR en tiempo real, se basan en la replicación en cadena de una secuencia específica de ADN o ARN mediante la catálisis de la proteína ADN-polimerasa bajo condiciones específicas de temperatura, dándose de forma controlada dentro de los termocicladores (22). Estas técnicas son caras y no solo requieren de personal especializado, también de equipos e infraestructura adecuada. Por esta razón se ha venido desarrollando una técnica alternativa llamada LAMP (amplificación mediada por bucles). Esta técnica se da bajo una reacción molecular isotérmica y permite que se pueda realizar el diagnóstico sin necesidad de un termociclador, lo que representa mejoras en la accesibilidad y en los costos (1,19,23).

C. Tratamiento:

En el Perú se ha venido aplicando el tratamiento denominado “Cura Radical” en infecciones no complicadas de *P. vivax*, a partir de las nuevas medidas antimaláricas traídas por el programa PAMAFRO (2005-2010). Este tratamiento consiste en primaquina (25 mg/kg x 3 días) + cloroquina (0.5 mg/kg x 7 días) por un periodo total de 7 días. Los compuestos de este tratamiento tienen como objetivo eliminar tanto a los estadios presentes en sangre (efecto de la cloroquina), como a los hipnozoitos en el hígado (efecto de la primaquina), para interrumpir el ciclo de transmisión del parásito (24). No obstante, conforme se ha ido aplicando el tratamiento en la población, han venido surgiendo problemas que están afectando la eficacia de la Cura Radical. En especial cuando se trata de los factores que afectan la primaquina, ya que es un medicamento que no tiene un reemplazo comercial. Estos problemas están relacionados a la falta de adherencia al tratamiento, polimorfismos genéticos en el hospedero como la deficiencia en las enzimas CYP2D6 y CPR que evitan una

adecuada metabolización del fármaco y las variaciones genéticas del parásito que pueden provocar cambios en la susceptibilidad del parásito al tratamiento (25). Esto último puede ir generando un desarrollo de resistencia al tratamiento; sin embargo, es algo que aún no se estudiado e identificado para *Plasmodium vivax* (21,26). Por otro lado, la dificultad de *P.vivax* para cultivarse *in vitro* limita a los avances en la identificación de genes de resistencia específicos para esta especie (1). Por esta razón, se viene desarrollando nuevos fármacos; el más importante es la tafenoquina, como reemplazo a la primaquina, el cual también tiene un efecto contra los hipnozoitos y actúa a partir de una sola dosis. Este tratamiento aún está en investigación y por ahora no se está aplicando en esta región (24).

III.1.3 Situación de la Malaria en el Perú: perspectivas del pasado y la actualidad

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), a nivel mundial, la incidencia de casos de malaria se redujo de 14.1 a 4.6 por cada 1000 habitantes en riesgo desde el año 2000 hasta la actualidad. Esto representa una disminución total del 58% en el número de casos y del 56% en la tasa de mortalidad hasta el 2020, permitiendo un escenario favorable en la lucha contra el paludismo (18). A pesar de todo lo mencionado, en los últimos 20 años, la malaria en el Perú ha tenido periodos intermitentes de aumento y disminución en el número de casos (Figura N°2).

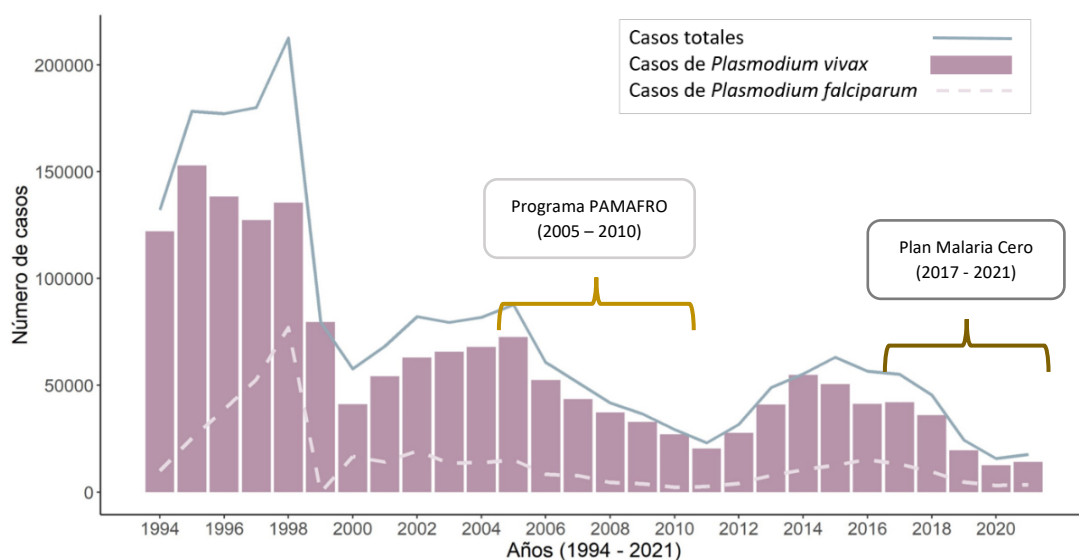


Figura N°2: Número de casos de malaria reportados en el Perú desde 1994 al 2021

Número de casos totales (SE52) de malaria durante los años 1994 – 2021. 2. La barra violeta representa al número de casos por *Plasmodium vivax*, las líneas punteadas a los casos por *Plasmodium falciparum* y la línea gris los casos totales. 3. El número total de casos del 2021 está representado hasta la semana epidemiológica 52.

Ello es consecuencia de las características epidemiológicas de esta enfermedad; que abarca desafíos respecto a los niveles heterogéneos de la transmisión, la insuficiencia en las técnicas de diagnóstico por la contribución de parásitos submicroscópicos y asintomáticos, la falta de adherencia al tratamiento por la población afectada y una variedad de estrategias de eliminación que se aplicaron o dejaron de realizar durante esos años (21,27).

Del 2005 al 2010, gracias a los esfuerzos del programa PAMAFRO (Control de malaria en fronteras), financiado por el Fondo Global y ejecutado por el Organismo Andino de Salud, se registró una notable disminución de los casos de malaria en varios países latinoamericanos, incluido el Perú (Figura N°2). Las estrategias del programa se enfocaban en fortalecer la participación comunitaria para implementar un diagnóstico precoz, un tratamiento eficaz, control integrado de vectores, educación, fortalecimiento del sistema de salud y mejoras en la vigilancia epidemiológica. En otras palabras, se buscaba fortalecer las estrategias de eliminación y que estas sean sustentables a través de los años (28). A pesar de las dificultades, en el Perú este programa tuvo un impacto positivo en la disminución de casos durante los siguientes años: de 87 805 casos registrados en el 2005 hasta los 29 339 casos en el 2010, donde se registró una tasa histórica de menos de 1 caso/1000 habitantes en riesgo (21,29) (Figura N°2). Estos resultados logrados por el programa PAMAFRO fueron principalmente consecuencia de la mejora en la entrega de mosquiteros tratados con insecticidas (LLIN), mejoras en las competencias de diagnóstico/tratamiento y la implementación de la detección activa de casos (DAC) (28) (21) (30). En paralelo, estas estrategias coincidieron de forma favorable con lo planteado por la OMS a finales de la década de los 2000 (31), los cuales se enfocaron principalmente en las fumigaciones, el uso de PDR, la implementación del tratamiento de 14 días para infecciones por *P. vivax* y el uso de mosquiteros tratados con insecticidas; siendo estos puntos investigados y evaluados también en el Perú (30,32–36).

A pesar de los esfuerzos realizados por el programa PAMAFRO, a partir del año 2012, el número de casos volvió a incrementarse por falta de continuidad y apoyo en las estrategias de control. Por consiguiente, el Ministerio de Salud (MINS) desarrolló el Plan Malaria Cero (26,29). Este fue un programa con enfoque comunitario e intercultural que se centró principalmente en la región de Loreto y tuvo como objetivo principal eliminar la malaria en esta región. Este plan provocó que los casos reportados

empezaran a descender de manera progresiva, llegándose a registrar para el 2020 un total anual de 15 235 casos, representando una disminución del 75.4% en comparación a lo registrado en Loreto en el año 2017 (37,38).

Así mismo, a partir del año 2022, el anterior Plan Malaria Cero se reestructuró y amplió para abarcar además de Loreto, el resto de regiones del Perú también afectadas por la malaria. El nuevo plan, llamado “Plan hacia la eliminación de la malaria (Primera Etapa: 2022 – 2030)”, busca retomar las estrategias ya planteadas y mejorarlas por medio de los avances que se tienen en la actualidad en el estudio de la enfermedad y el parásito. Algunas de estas estrategias son ejercer mejoras a nivel del diagnóstico, tratamiento, reducción de la transmisión, educación y optimización de la vigilancia. En consecuencia, este nuevo programa plantea tres fases de acción (20):

- Primera fase – Fase control (4 años): reducción de la malaria clínica en un 70%, con un enfoque en zonas de alta y muy alta endemicidad.
- Segunda fase – Hacia la eliminación (5 años): reducción drástica de la malaria asintomática y submicroscópica, con la meta de reducir la malaria a un 90%.
- Tercera fase – Eliminación de la malaria (15 años): eliminación total de la malaria residual y de casos exportados.

En la actualidad, la alta incidencia de casos asintomáticos y submicroscópicos, da una alta relevancia a la segunda fase y a los desafíos que involucra la malaria residual.

III.1.4 Las infecciones asintomáticas: definición, características y problemática

III.1.4.1 Definición y mecanismo inmunológico:

El principal síntoma del paludismo es la fiebre periódica, que puede venir acompañada de otros síntomas clásicos como el dolor de cabeza, mareos, anemia, náuseas, diarrea, dolores musculares y abdominales (13). Según lo mencionado, una infección asintomática se define como una infección en la que no se presentan estos síntomas.

Las infecciones asintomáticas han sido relacionadas con el desarrollo de inmunidad en participantes que conviven de forma prolongada con el parásito, sin importar incluso la endemicidad del área afectada (39–41). Esto se ha podido observar en regiones altamente endémicas como Papúa Nueva Guinea (42) y en otras de baja transmisión

como Tailandia (43), donde se han registrado incluso a menores de 5 años con infecciones asintomáticas (44). Frente a un escenario normal, la infección del parásito promueve la respuesta inflamatoria temprana, mediante citoquinas, como el factor tumoral necrosante alfa (TNF- α), interferón gamma (IFN- γ) e interleucina 12 (IL-12), que son reguladas por las células antiparasitarias TH1 (T-helper), lo que permite un desarrollo normal de la enfermedad. Sin embargo, al haber una respuesta pro inflamatoria, la respuesta antiinflamatoria de las células TH2 también empieza a actuar como un regulador (45,46). En consecuencia, frente a una sobrestimulación de las citoquinas inflamatorias, se va produciendo un equilibrio de respuestas TH1/TH2, que va generando a través de los estímulos constantes una resistencia contra la patogenicidad. Estudios muestran que las citoquinas antiinflamatorias como el Factor de Crecimiento beta (TGF- β), IL-10 y IL-27 están principalmente involucradas en la supresión de la TH1 y en promover la formación de infecciones asintomáticas. Debido a esto, se ha observado que células CD4 y Células T en personas muy expuestas segregan niveles altos de IL-10, mientras que personas menos expuestas segregan mayores niveles de TNF- α (45,47,48). Por otro lado; se ha evaluado que la regulación de Células T presenta diferencias entre individuos asintomáticos y sintomáticos. Esto se observó en niños sintomáticos, que frente a una mayor producción de Células T, ocurre una disminución de la respuesta inmune y se promueve la formación de altas parasitemias; sin embargo, en individuos asintomáticos la producción de Células T es similar a la de personas sanas y menor que en individuos sintomáticos, lo que resulta en bajas parasitemias (47,49).

III.1.4.2 Problemática en el Perú:

En el Perú para el año 2020, las infecciones por *P. vivax* representaron el 80% de los casos totales registrados, convirtiéndose en la especie dominante, superando a *P. falciparum* y *P. ovale* en el país (37). Además, se sabe que el espectro de la enfermedad tanto de *P. vivax* y *P. falciparum* puede manifestarse desde una infección asintomática, presentarse como una enfermedad febril sin complicaciones hasta incluso desarrollarse la malaria grave o severa (50).

Bajo el escenario actual de disminución de casos reportados en malaria, el último reporte presentado por el Ministerio de Salud muestra que el índice anual de infecciones asintomáticas representa el 73% de los casos totales (20). Además, estudios en la Amazonía Peruana reportaron que las infecciones asintomáticas por

parásitos de *P. vivax* presentes en sangre son frecuentes, del 50 a más 90% del total de las infecciones identificadas en diferentes estudios en la Amazonía Peruana (51–56).

Al considerar las bajas parasitemias típicas de individuos asintomáticos infectados por *P. vivax*, estudios en el Perú han observado que del 50% a más del 80% de las infecciones submicroscópicas eran asintomáticas (52–54,57). Estas infecciones dificultan la detección del parásito por el personal de salud y evidencian la necesidad de complementar el diagnóstico microscópico con uno molecular. Por otro lado, está presente la capacidad de *P. vivax* de presentar gametocitos de manera rápida y continua durante su ciclo de vida en el hospedero (15,16). Esto se pudo observar durante un estudio realizado en las comunidades de Cahuide y Lupuna (provincia de Maynas, Loreto), donde se identificó que el 59.8%, de los portadores de gametocitos por *P. vivax* eran asintomáticos y el 31.9% eran submicroscópicos (56).

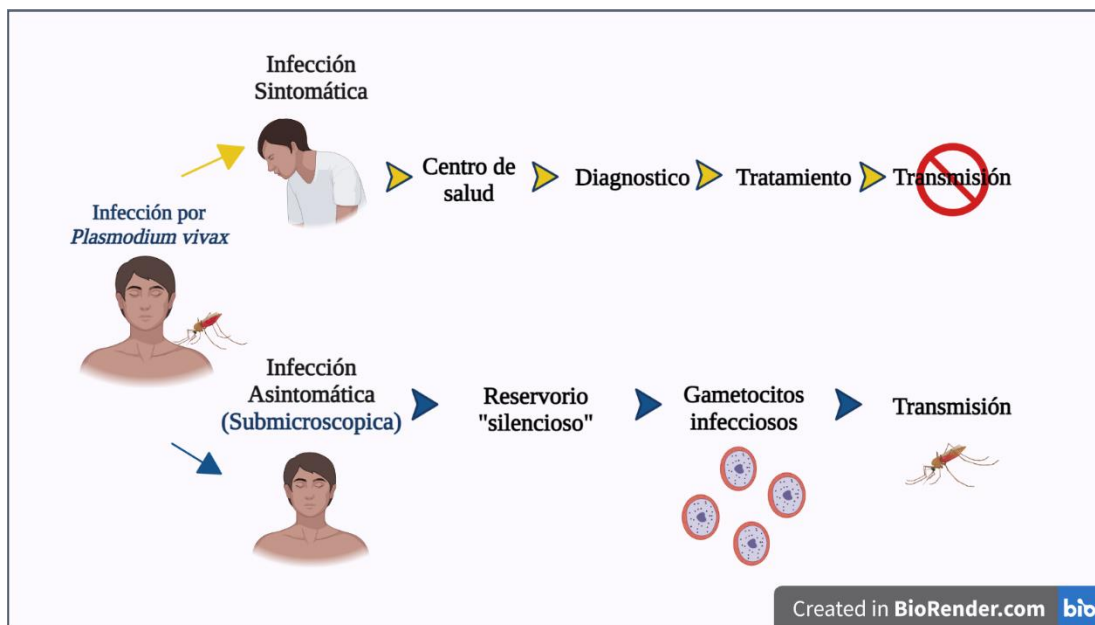


Figura N°3: Transmisión de la malaria según presencia de síntomas

Diagrama sobre los dos escenarios típicos de una infección por *Plasmodium vivax*. Las flechas amarillas muestran el escenario que enfrenta una infección sintomática y las flechas azules muestran el escenario que enfrenta una infección asintomática.

Con todo lo mencionado, frente a una infección por *P. vivax*, se pueden desarrollar dos distintos escenarios (Figura N°3). El primero es acerca de una infección sintomática: la persona al verse afectada por los síntomas recurre a un centro de salud, se le somete a un diagnóstico, de ser positivo, recibe un tratamiento y la transmisión se interrumpe (en condiciones ideales). Mientras que, en el segundo escenario, se presenta una

infección asintomática: la persona infectada no se ve afectada por síntomas y, por lo tanto, no recurre a un centro de salud. De este modo, el individuo se convierte en un reservorio silencioso. La producción de gametocitos y posterior picadura por un nuevo mosquito permite la continuidad de la transmisión. No obstante, la naturaleza de la infección por *P. vivax* puede llegar a ser más compleja; presentando casos donde una infección sintomática no siempre es microscópica o que una infección asintomática con baja parasitemia muchas veces no llega a generar gametocitos infecciosos en densidades representativas para la transmisión (58). Así mismo, al igual que las infecciones asintomáticas existen otros factores como la presencia de recurrencias que representan un desafío en los esfuerzos realizados para la eliminación de la malaria en el Perú (21).

III.1.5 Recurrencias por *Plasmodium vivax* y su relación con la malaria residual

Una característica importante y única de *P. vivax* es la formación de hipnozoitos dentro de la fase pre-eritrocítica en las células hepáticas. Estos hipnozoitos pueden permanecer en latencia dentro del individuo, deteniendo su desarrollo por semanas, meses y hasta años después de la primera inoculación (14).

Las recurrencias son infecciones que se manifiestan mediante merozoitos presentes en sangre posterior a un diagnóstico positivo a malaria y de su respectivo tratamiento. Estas se dan por tres razones (3,59):

- **Re-infecciones:** que suceden durante la inoculación de nuevos parásitos en un nuevo evento de picadura de mosquito.
- **Recrudescencia:** se dan frente a resistencia al medicamento o por factores que interfieran en el éxito del tratamiento antimalárico.
- **Relapsos:** provocados por activación de hipnozoitos localizados en el hígado.

A través de una correcta identificación de las recurrencias, se podría tener un mejor entendimiento de los factores que podrían estar involucrados y con esto implementar medidas focalizadas para contrarrestar el efecto de las recurrencias en la transmisión del parásito. En el Perú se han realizado pocos estudios que se enfoquen en los episodios recurrentes de *P. vivax*. Dos de estos estudios se basaron en el tratamiento, buscando alternativas más eficaces que contrarresten la aparición de recurrencias, una

a partir de la evaluación de las dosis de primaquina (60) y la otra al comparar la eficacia de la Cura Radical vs la Tafenoquina (61). Otros estudios han evaluado a las recurrencias a partir de su variación genética con el día inicial de la infección, encontrando resultados distintos, uno determinó que un 90% de las recurrencias presentaron los mismos haplotipos que la infección inicial (62); mientras que el otro estudio encontró que la mayoría de las primeras recurrencias difieren en su genotipo a las infecciones iniciales (63). En ambos casos se buscaba encontrar pistas acerca del origen de la recurrencia. Sin embargo, el poder discriminar una recurrencia entre relapso, reinfección o recrudescencia tiene una alta complejidad; por esta razón, existen esfuerzos en marcha para identificar los tipos de recurrencias por secuenciación profunda del ADN de los parásitos (Secuenciación de Nueva Generación que se basa en el secuenciamiento múltiple de una región genómica) (64–66) y por modelos matemáticos predictores (67,68).

En el Perú se aplica el tratamiento Cura Radical; sin embargo, conforme se ha ido proporcionando en la población, han venido surgiendo problemas que están afectando la eficacia del tratamiento. Estudios realizados en la región de Loreto muestran que las recurrencias se siguen registrando a pesar del tratamiento y estas son más frecuentes en infecciones por *P. vivax* (1,55,57,69). Las causas se dan principalmente por la falta de adherencia al tratamiento en la población (efectos adversos, falta de seguimiento, mala aplicación del tratamiento, etc.) o por resistencia al fármaco (24,33,63,70). Esto provoca que la detección del tipo de recurrencia tenga más complejidad, al no poder descartar a los relapsos y las recrudescencias de forma certera por el tratamiento.

En el departamento de Loreto (Perú), dentro de las comunidades de los distritos de Iquitos y San Juan se han reportado entre 55% a 65% de recurrencias asintomáticas y submicroscópicas del total de recurrencias analizadas de *P.vivax* (1,57). Las recurrencias asintomáticas se presentan consecutiva o intermitentemente durante la infección. Esto genera una dificultad para detectarlas y tratarlas correctamente. Finalmente, los episodios recurrentes y asintomáticos por *P. vivax* favorecen que las personas infectadas se conviertan en reservorios humanos para la transmisión continua del parásito.

III.1.6 Epidemiología molecular de las recurrencias: dinámica de cambio en el aspecto genético y sintomatológico

El estudio de recurrencias por *P. vivax* presenta una complejidad que va más allá de la detección del tipo de recurrencia. Esto se debe a que existen múltiples factores que están involucrados a nivel de la genética y la biología del parásito. En consecuencia, cada recurrencia presenta aspectos únicos que dificultan su clasificación, origen y eliminación (12,27). En la Amazonia Peruana, existen ciertas zonas con endemicidad media a alta, donde los pobladores presentan una constante exposición al parásito y por esta razón, presentan un historial de infecciones múltiples (21). Estas infecciones son tratadas; sin embargo, existe la posibilidad de que la adherencia al tratamiento no sea exitosa o que exista resistencia a los fármacos, lo que podría provocar la permanencia de los hipnozoitos en el hígado (21,27). En conjunto, la permanencia de hipnozoitos latentes con distintas características genéticas, junto con las constantes infecciones nuevas, crean un ambiente que está favoreciendo a la diversidad genética del parásito a nivel intra-hospedero (71).

A continuación, se describe un escenario modelo sobre las infecciones recurrentes a nivel biológico. Frente a la evaluación de la primera infección se realiza un tratamiento controlado y supervisado para asegurar la adherencia del tratamiento en el individuo. En este caso es probable que este individuo al estar constantemente expuesto al parásito, ya presente hipnozoitos en estado de latencia con líneas genéticas distintas (Figura N°4.B)(12). A partir de este escenario se pueden dar distintos tipos de recurrencias a nivel de su genética; ya sea por el número de haplotipos genéticamente distintos (monoclonales/policlonales) o por las diferencias con los genotipos de la primera infección (homóloga/heteróloga) (Conceptos III: Conceptos y clasificaciones 3.1). Según el ejemplo descrito, durante la primera infección controlada no se llega a activar ningún hipnozoito del hígado y se desarrolla la fase sanguínea como una primera infección monoclonal (Figura 4.C). Transcurrida la enfermedad, se da una nueva activación de hipnozoitos luego de semanas, meses o hasta años; que podría ser o no provocado a causa de una reinfección (Figura 4.E). Estos hipnozoitos al presentar distintas líneas genéticas desarrollan una recurrencia policlonal y al presentar diferente genotipo en comparación a la primera infección también se presenta como una recurrencia heteróloga (Figura N°4.F). De esta manera se pueden ir presentando

múltiples recurrencias con distintas características genéticas ya sean causadas por lapsos, reinfecciones o recrudescencia (Figura N°4).

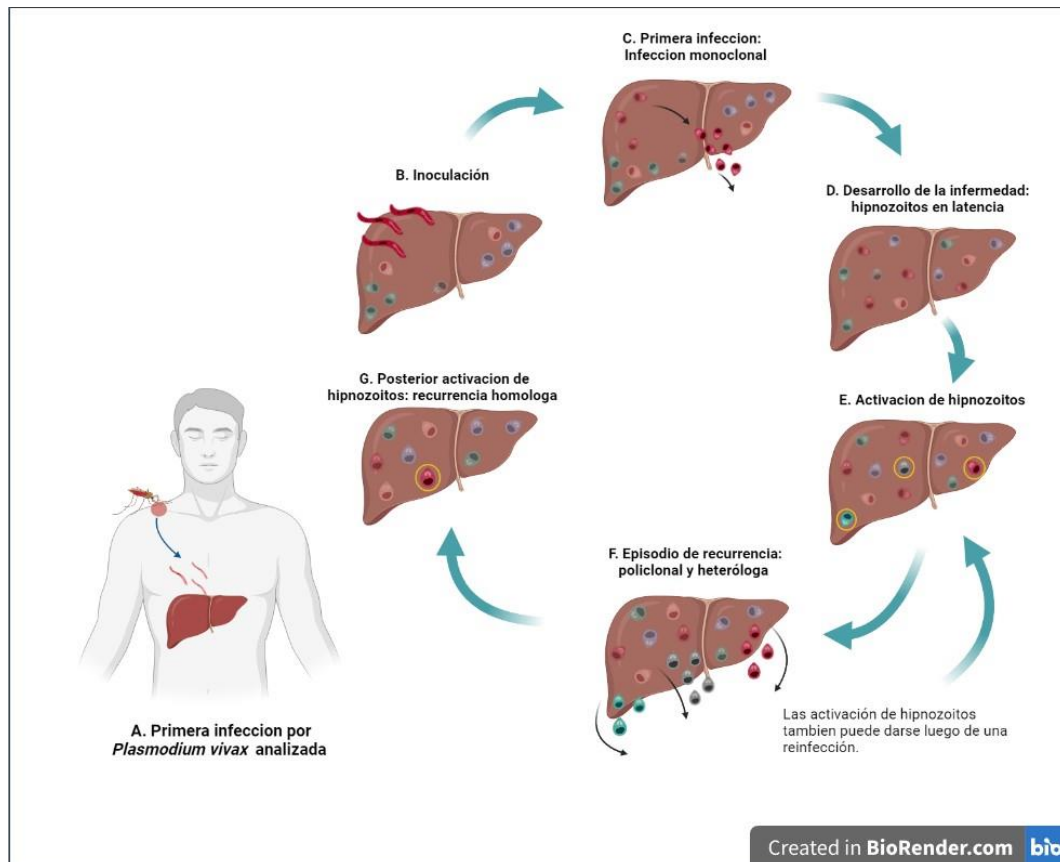


Figura N°4: Ciclo de la recurrencia de *P. vivax* a nivel de la fase hepática en el hospedero

Diagrama sobre el ciclo de la recurrencia dentro de la fase hepática de *Plasmodium vivax* en el hospedero. Los colores diferencian las líneas genéticas de cada parásito A y B, representan la inoculación del parásito en el hígado del hospedero; C, muestra la transición de la fase hepática a la sanguínea de la primera infección donde solo se desarrollan parásitos de una sola línea genética; D, muestra el estado de un hígado con distintos hipnozoitos provenientes de diferentes líneas genéticas en estado de latencia; E, representa la activación de hipnozoitos con distintas líneas genéticas debido a características biológicas del hipnozoito y el hospedero o a una nueva reinfección; F, muestra cómo se da el episodio recurrente a través del desarrollo de hipnozoitos que provienen de distintas líneas genéticas (recurrencia policlonal) y siendo distinta a la primera infección (recurrencia heteróloga); G, representa una nueva activación de hipnozoitos después de determinado tiempo y en este caso teniendo solo parásitos con misma línea genética de la infección inicial (recurrencia homóloga y monoclonal)

En el Perú, un estudio realizado en la comunidad de San Carlos, dentro de la región de Loreto, muestra como en esta comunidad aislada a través de dos años de seguimiento, la frecuencia haplotípica en las recurrencias disminuye o aumenta para determinados haplotipos y el número de estos va aumentando solo de un año a otro. También se observa un incremento en la diversidad genética, a pesar de tratarse de una población

parasitaria en su mayoría monoclonal (57). Otro estudio, que evaluó distintas comunidades cercanas a la ciudad de Iquitos, también evaluó la dinámica y origen de las recurrencias causadas por *P. vivax*. Aquí se observó que el 78.6% de los parásitos evaluados en la recurrencias eran heterólogos en comparación a la primera infección, además que estas recurrencias heterólogas estaban altamente relacionadas, considerándose relapsos (1). En síntesis, existen distintos escenarios donde se pueden evaluar y caracterizar las recurrencias, ya que estas presentan una dinámica activa en sus características genéticas entre los episodios. Además, Loreto presenta un escenario complejo donde se observan áreas con distintos niveles de flujo génico y aislamientos que generan estructuración poblacional (1) (71,72). Sin embargo, además de los aspectos genéticos, también se han observado cambios a nivel de la presencia de síntomas (sintomáticos/asintomáticos) y el estatus de diagnóstico (microscópico/submicroscópica) a través de los episodios recurrentes. Estos factores aún no se han evaluado a nivel de recurrencias en el Perú, pero sí en comunidades de Camboya (73) y Vietnam (74) .

III.1.7 Factores asociados a recurrencias: importancia en la epidemiología de la malaria

Al evaluar las características de la infección asintomática por *P. vivax*, sus episodios recurrentes y su dinámica de cambio a nivel genético y sintomatológico; se observa que existen distintos factores que podrían estar asociados a nivel del hospedero, el medio y el parásito. Por lo tanto, conocer el tipo de asociación de estos factores a las recurrencias asintomáticas podría ser una herramienta importante para la prevención de la enfermedad y proporcionar un mayor conocimiento sobre la evolución de las mismas. En la actualidad, existen estudios en países como Brasil, Vietnam y Malasia que han encontrado factores asociados a recurrencias por *P. vivax* (Tabla N°1).

Tabla N°1: Factores asociados a recurrencias en infecciones por *P. vivax*

Artículo	Autor principal	Año de las muestras	Factores
----------	-----------------	---------------------	----------

An Ultra-Sensitive Technique: Using Pv-mtCOX1 qPCR to Detect Early Recurrences of Plasmodium vivax in Patients in the Brazilian Amazon.	Laila R. A. Barbosa, 2021 (66)	2011 – 2017	Presencia de gametocitos D0
A clinical tool to predict Plasmodium vivax recurrence in Malaysia	Norliza Mat Ariffin, 2017 (75)	2011 – 2016	Edad (menores de edad) Gametocitos en D0 Etnia Tipo de tratamiento
Plasmodium vivax morbidity after radical cure: A cohort study in Central Vietnam	Thanh Vinh Pham, 2019 (74)	2009 – 2011	Infección previa por <i>P. falciparum</i> Tratamiento previo Etnicidad
Evaluation of Plasmodium vivax malaria recurrence in Brazil	André Daher, 2019 (76)	2014 -2015	Menores 3 años Hombre Alfabetizado Etnicidad Actividades domesticas
Malaria-related hospitalization during childhood in Papua, Indonesia: A retrospective cohort study	Nicholas M. Douglas, 2019 (77)	2004 – 2013	Infección previa por la misma especie Etnicidad
Plasmodium vivax Recurrence Following Falciparum and Mixed Species Malaria: Risk Factors and Effect of Antimalarial Kinetics	Nicholas M. Douglas, 2011 (78)	1991 – 2005	Infección mixta Edad y sexo Hematocrito bajo Alta densidad parasitaria D0 Gametocitos de <i>P. falciparum</i> D0
Factors associated with recurrent Plasmodium vivax malaria in Porto Velho, Rondônia State, Brazil, 2009	Luciano Rodrigues Simões, 2014 (79)	2009	Hombre Menos tiempo de síntomas Alta densidad parasitaria D0

Estos factores pueden estar caracterizados según el parásito, el hospedero y su medio. Entre los factores relacionados al parásito (la infección) se encontraron: presentar infecciones mixtas, infecciones submicroscópicas, la densidad parasitaria y presencia de gametocitos. Por otro lado, entre los factores relacionados al hospedero resultaron: sexo, edad, insuficiencia en la producción de G6PD, etnicidad, permanencia en la comunidad y actividades domésticas; siendo todos estos factores ya considerados en estudios previos (74–76,80–84) (Tabla N°1). Sin embargo, en ninguno de estos

estudios se ha llegado a considerar como objetivo principal el estudio a las recurrencias asintomáticas; tanto en el Perú como en otras partes del mundo.

En resumen, conforme a todos los conceptos ya mencionados en este trabajo, es necesario también considerar características genéticas del parásito. Por ejemplo, se debe explorar factores como el número de clonas en un aislado (monoclonal o policlonal), de las diferencias genéticas del parásito recurrente respecto a la infección inicial (homóloga o heteróloga) y el nivel de diversidad genética por área de estudio, siendo estos factores poco considerados en estudios anteriores. En ese contexto, el estudio de los factores asociados al desarrollo de recurrencias asintomáticas por *P. vivax* es una herramienta importante para enfrentar los desafíos de la malaria en el Perú.

III.2 Planteamiento del Problema

La malaria continúa siendo una enfermedad persistente en la Amazonía Peruana, donde se concentra el 80% de los casos registrados en el país y cuya transmisión es dominada por la especie *Plasmodium vivax* (21,37). En este contexto, debido a la exposición constante de los individuos con el parásito, se desarrolla en ellos una inmunidad adquirida que promueve la aparición de infecciones asintomáticas (45,47,49). En consecuencia, estas infecciones representan un gran desafío para la eliminación de la malaria en el Perú, ya que en la actualidad, las infecciones asintomáticas por *P. vivax* presentan una incidencia anual del 73% de los casos totales (20). Si esta infección no es detectada, tampoco es tratada y convierte al individuo en un reservorio silente de la enfermedad. Más aún cuando estas infecciones presentan la capacidad de formar gametocitos y promover la transmisión del parásito (56).

Otro desafío en la eliminación de la malaria son los episodios recurrentes. En el caso de *P. vivax* existe un estadio latente en el hígado llamado hipnozoito, que puede permanecer dentro de los individuos por un periodo indeterminado de tiempo para luego activarse y provocar un relapso (2,15). A partir de esto, la OMS recomienda el uso del tratamiento cura radical, que tiene la capacidad de eliminar a los hipnozoitos en el hígado y evitar que se den recurrencias ocasionadas por relapso (21,67). Sin embargo, las recurrencias también pueden darse por recrudescencias (falta de adherencia al tratamiento) y reinfecciones; siendo este un problema, ya que en el Perú se siguen dando casos de recurrencias a pesar de la aplicación de dicho tratamiento en la población (63,72).

Dicho esto, en la actualidad, la aparición de recurrencias asintomáticas suman ambos desafíos, ya que estos implican que se dé un mayor refuerzo tanto a nivel de la detección como en el diagnóstico para un monitoreo eficiente de estas recurrencias (20,21,27). Más aun cuando se ha estudiado muy poco sobre recurrencias asintomáticas en esta región. De esta manera, identificar los factores asociados a las recurrencias asintomáticas permitiría tener un mejor enfoque en las medidas de control para grupos específicos y reducir significativamente la transmisión de la malaria.

III.3 Justificación del estudio

Los casos de malaria en el Perú han disminuido significativamente durante los últimos años, poniendo en evidencia la alta prevalencia de casos asintomáticos por *P. vivax*. En particular, estas infecciones crónicas son un gran desafío para la eliminación de la malaria. Este estudio busca generar información sobre la evolución de la presencia de síntomas a lo largo de las recurrencias en individuos monitoreados por 2 años después de recibir el tratamiento de cura radical. Por lo tanto, con estos resultados se busca determinar qué factores favorecen la generación de recurrencias asintomáticas y así entender la relación de estas infecciones con el ser humano. Esto es clave para adaptar las estrategias de eliminación y hacer que las intervenciones sean más eficientes. Por otro lado, los episodios recurrentes no solo favorecen la permanencia de *P. vivax* en el medio, además, permite el desarrollo de inmunidad en los individuos a través de la constante exposición al parásito. Por esta razón, factores relacionados a la genética del parásito deben ser evaluados, ya que puede describir el potencial de la población parasitaria de mejorar su capacidad de supervivencia. En conclusión, esta investigación busca brindar información valiosa que pueda ser útil en el estudio de recurrencias asintomáticas, mediante el análisis a nivel genético y sintomatológico. Se busca evaluar qué factores están asociados a este tipo de infecciones y cómo estas podrían usarse para prevenirlas. Ello se debe ejecutar de forma focalizada para cada población y puede servir de apoyo a las futuras estrategias implementadas en la segunda fase del nuevo Plan hacia la eliminación de la malaria.

IV. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

IV.1 Pregunta de investigación:

¿Existen características del hospedero y de la infección (parásitos) asociadas a experimentar recurrencias asintomáticas de *Plasmodium vivax* luego del tratamiento de cura radical en las comunidades amazónicas de la región de Loreto?

IV.2 Hipótesis:

La diversidad genética intra-hospedera, la presencia de gametocitos previo al inicio del tratamiento, la edad, el sexo del individuo y la localidad son factores que están asociados con el evento de experimentar al menos una recurrencia asintomática en personas que recibieron el tratamiento cura radical completo para tratar la infección por *P. vivax*. Además, estos factores asociados a las recurrencias asintomáticas podrían variar a lo largo del tiempo entre los episodios de recurrencias en los individuos.

IV.3 Objetivo general:

Evaluar los factores asociados a episodios recurrentes asintomáticos por *Plasmodium vivax* y la evolución de estos factores en un estudio longitudinal con seguimiento sistemático de los participantes en comunidades amazónicas durante dos años.

IV.4 Objetivos específicos:

1. Caracterizar la infección detectada previa al tratamiento y las recurrencias clasificadas según presencia o no presencia de síntomas (asintomáticas/sintomáticas).
2. Determinar la tasa de recambio sintomático/asintomático (o viceversa) a lo largo del estudio.
3. Determinar el riesgo de experimentar una recurrencia asintomática o sintomática y determinar su dinámica temporal.
4. Evaluar la evolución de la diversidad intra-hospedero del parásito a lo largo del tiempo determinando la densidad de incidencia de los episodios recurrentes.

5. Identificar los factores del parásito y del hospedero asociados a experimentar recurrencias asintomáticas y sintomáticas.

V. MÉTODOS

V.1 Conceptos y clasificaciones:

V.1.1 Infecciones asintomáticas:

Según la OMS, la malaria o paludismo es una enfermedad febril aguda provocada por parásitos de género *Plasmodium*, las fiebres son el resultado de la liberación de los merozoitos por los esquizontes dentro de los eritrocitos, lo que provoca su ruptura y generación de fiebre en el hospedero cada vez que se cumple el ciclo (85) (86). Frente a infecciones leves, además de las fiebres se pueden presentar otros síntomas como cefalea y escalofríos (85). Sin embargo, para este estudio, como en otros realizados con la misma data (57)(71), se considerará como infección sintomática aquella que presente fiebre (temperatura axilar $> 37.5^{\circ}$) en el momento de la intervención (incluido 48 horas antes del D0). Así mismo, una infección asintomática se considerada a aquella que no presente fiebre (incluido 48 horas antes del D0), pero que presente parásitos circulantes a nivel sanguíneo.

V.1.2 Multiplicidad de infección (MOI):

La multiplicidad de infección es el número promedio de haplotipos de los parásitos de *P. vivax* que se encuentran infectando a una persona. Las infecciones según multiplicidad de infección (MOI) se clasifican en monoclonales (1 alelo por loci) y policlonales (≥ 2 alelos en al menos un locus); definiéndose como el número de haplotipos genéticamente distintos dentro de un aislado. Para este estudio, el MOI se calculó a partir del análisis de 14 microsatélites (MS) neutros y tomándose al locus con el mayor número de alelos como la referencia (71).

V.1.3 Comparación de genotipos: D0 vs recurrencias (variabilidad genética)

La comparación de genotipos clasifica a las recurrencias en homólogas y heterólogas. La variabilidad se calculó a partir de la comparación en pares del genotipo de las recurrencias con la infección inicial; en consecuencia, una recurrencia heteróloga se define como aquella que presenta alelos diferente en al menos un locus en comparación a la infección inicial.

V.1.4 Densidad parasitaria y otros conceptos:

La densidad parasitaria se mide en parásitos/ μ l y durante el estudio madre solo se determinó la densidad detectada por microscopia. Debido a esto para las densidades parasitarias de las infecciones submicroscópicas (no detectadas por microscopia y solo por PCR) se consideró un mínimo representativo de densidad de 10 parásitos/ μ l. Con respecto a la evaluación de la edad en los individuos, se considerarán 4 categorías: menores de 5 años, de 6 a 15 años, de 16 a 60 años y mayores de 60 años. Entre estas categorías hay una división principal de menores (menores de 5 / 6 a 15 años) y mayores de 15 años (16 a 60 años/ mayores de 60); debido a que en investigaciones previas observaron una diferencia significativa entre estos grupos de edades en su respuesta inmune durante una infección por *Plasmodium vivax* (87).

V.2 Áreas de estudio:

Los individuos evaluados en este estudio provienen de 29 comunidades pertenecientes al departamento de Loreto y que se encuentran dentro de los distritos de Iquitos y San Juan (Anexo N°1). Estas comunidades fueron categorizadas en 4 áreas de estudio (A1, A2, A3, A4), siendo una categorización modificada de una ya aplicada en estudios previos (71). Esta categorización se ha realizado según su proximidad geográfica (Figura N°5):

- A1: conformada por comunidades a las que solo se puede acceder a través del río Nanay y que se encuentran de 3 a 7 km al noroeste de la ciudad de Iquitos.
- A2: conformada por comunidades urbanas cercanas a la ciudad de Iquitos.
- A3: conformada por las comunidades situadas a lo largo de la carretera Iquitos – Nauta de 11 a 13 km al suroeste de la ciudad de Iquitos.
- A4: conformada por comunidades situadas a 21 km al suroeste de la ciudad de Iquitos y de 2 a 9 km de la carretera Iquitos – Nauta, estando cerca al río Itaya.

De estas áreas se consideran a A1 y A4 como las más aisladas y de difícil acceso, mientras que A2 y A3 están cercanas a la ciudad o son de fácil acceso debido a la carretera. Los pobladores que conforman estas áreas son en general mestizos con bajos recursos económicos y que se dedican principalmente al pequeño comercio en base a la agricultura, la caza, la pesca y la tala. Estas comunidades en su mayoría presentan

un paisaje con numerosos pozos de agua, que sirven como reservas o como piscinas para el uso de crianza de peces. Además, se enfrenta la falta de agua potable y electrificación, especialmente en las áreas rurales (A1, A3 y A4), donde mayormente sus casas son de madera o pona y techadas con calamina. Estas comunidades han sido evaluadas e incluidas dentro de los planes de eliminación antimaláricos desarrollados por el programa PAMAFRO, a excepción de las comunidades de A4.

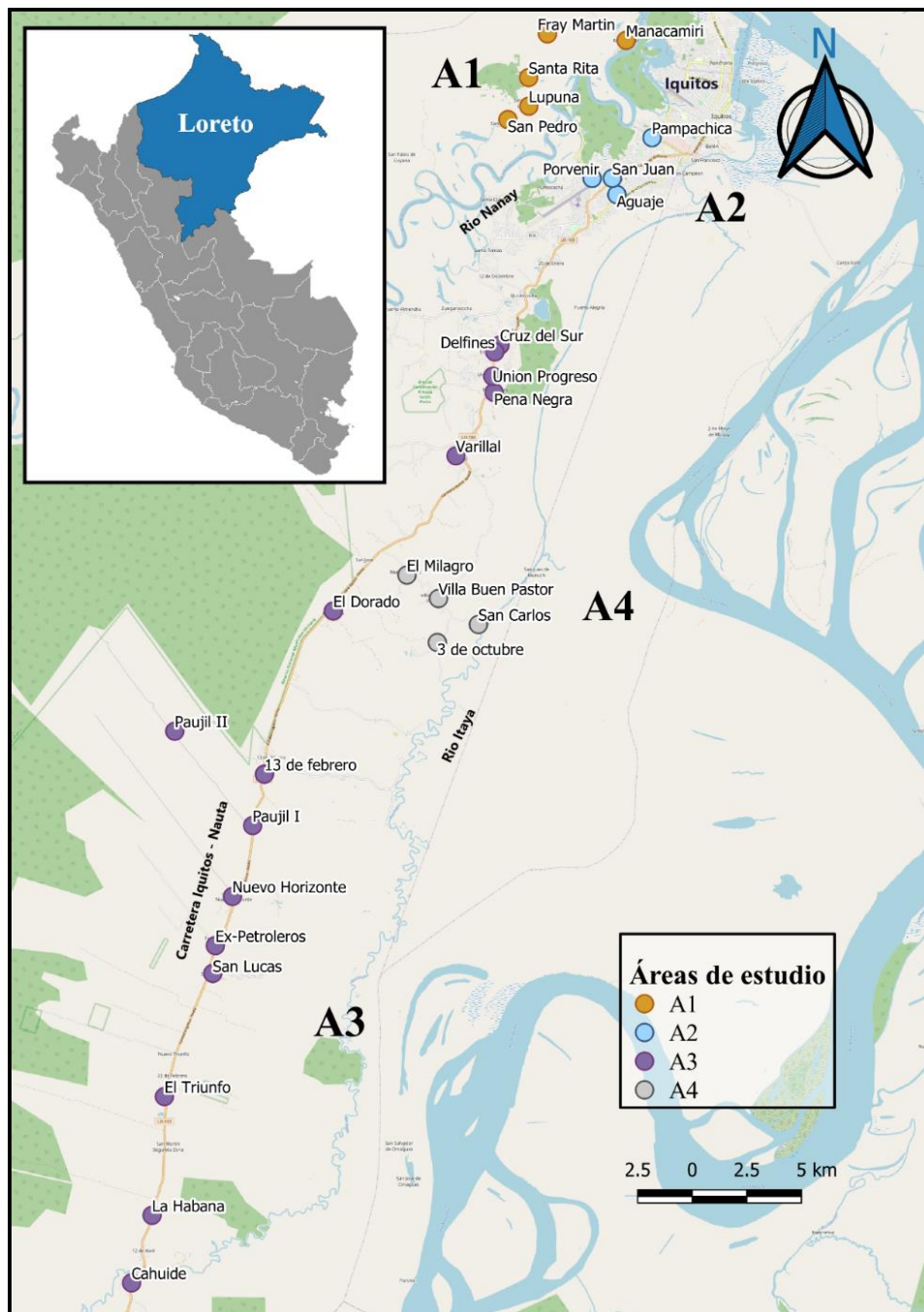


Figura N° 5: Mapa de las áreas de estudio.

Se presenta a las comunidades evaluadas y divididas en áreas de estudio (A1, A2, A3 y A4). Ninguna comunidad evaluada se ubicaba dentro de la ciudad de Iquitos.

V.3 Diseño del estudio:

Para este trabajo se realizó un análisis retrospectivo de la base de datos de un estudio con cohorte longitudinal del proyecto PVIVAX-UPCH (código SIDISI: 053256). Este proyecto tenía como objetivo principal el evaluar la eficacia del tratamiento cura radical, cloroquina más primaquina, en infecciones por *P. vivax* en la prevención de recaídas. El diseño de estudio del proyecto PVIVAX-UPCH consistió en la identificación de los individuos infectados por *P. vivax*, en 29 comunidades con alta prevalencia del parásito (Anexo N°1). Los individuos participantes fueron reclutados e identificados mediante detección activa de casos (a través de visitas a las casas) y por detección pasiva en las postas de salud (por detección de casos febriles a través de microscopía). Esta etapa se realizó durante los meses de abril del 2008 a octubre del 2010; hasta completar los 302 individuos que conforman la cohorte del estudio. En el transcurso de la primera semana de seguimiento, el tratamiento fue administrado diariamente hasta completar el esquema recomendado por el MINSA (cloroquina 25 mg/kg por 3 días + primaquina 0.5 mg/kg por 7 días). Luego se realizaron seguimientos semanales hasta el día 28 y posteriormente se realizó un seguimiento mensual sistemático hasta el mes 24 después del tratamiento. Durante los tres primeros días de tratamiento y luego de cada visita programada el diagnóstico que se realizó fue por microscopía. A partir de las muestras sanguíneas (Gota gruesa) colectadas en cada intervención; y por diagnóstico molecular por PCR, de las colecciones de muestras de sangre en papel filtro (BSFP) (Whatman 3° grado, Springfield Mill, USA). Para el diagnóstico molecular se realizó la reacción en cadena multiplex semi-anidada (ssPCR) para la detección específica de especie (88). Para casos de recurrencias confirmados por *P. vivax* durante los primeros 28 días, se administró Cloroquina (25 mg/kg) por 3 días; pasado este tiempo, al aparecer nuevamente recurrencias, se les volvió a aplicar el tratamiento completo. Si la infección era por *Plasmodium falciparum* o mixta se trató con Mefloquina-Artesunato.

Estas muestras también pasaron por un análisis molecular realizado en un estudio previo, a las que se le realizó la genotipificación por 14 microsatélites neutros (MS1, MS2, MS3, MS4, MS5, MS6, MS7, MS8, MS9, MS10, MS12, MS15, MS16, MS20) a cada muestra positiva colectada (71,72). Estos microsatélites optimizados son específicos para la detección alta de polimorfismos en *P. vivax*, los cuales presentan un protocolo idéntico de amplificación, lo que ayuda en la estandarización de un

protocolo múltiple (89). Sin embargo, para este trabajo la amplificación se realizó a partir de reacciones individuales de cada MS con sus respectivos cebadores. Luego los fragmentos fueron analizados por electroforesis capilar por el secuenciador 3730XL ABI y el análisis del tamaño de los fragmentos por el programa Genemapper (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Según el criterio de selección de las bandas, si estas eran menores a 100 unidades relativas de fluorescencia (relative fluorescence units - RFU) se consideraban como bandas ancestrales; mientras que si presentaban ≥ 100 RFU se consideraron alelos reales. En los casos donde se encontraron de dos o más alelos se consideró para el análisis aquel considerado dominante, siendo el que presentaba $\geq 30\%$ de RFU totales. Además, si las muestras no llegaban a amplificar en el PCR en algunos loci, la muestra era reanalizada (71). Finalmente, todos estos ensayos moleculares no fueron realizados en este trabajo, sino en estudios previos, los cuales brindaron esta información a través de una data ya categorizada.

V.4 Análisis estadísticos:

Cada análisis realizado en este estudio responde a un objetivo específico planteado (Tabla N°2). El análisis estadístico de la data de este proyecto se realizará por medio de los programas R y RStudio (Versión 1.4.1717), mediante los paquetes *survival*, *survminer*, *BSDA*, *Rmisc* y *Forecats*, todos disponibles de forma gratuita en la base de datos del programa.

Las variables no presentaron una distribución normal. Por tanto, para realizar la caracterización de las infecciones entre asintomáticas y sintomáticas, se calcularon sus medianas y rangos intercuartiles (RIQ) de las características cuantitativas del estudio: la densidad parasitaria (parásitos/ μ l), número de gametocitos (parásitos/ μ l) y tiempo de aparición (días). Por otro lado, para evaluar si hay diferencias significativas en estas características entre infecciones asintomáticas y sintomáticas, las variables cuantitativas transformadas al log₁₀ pasaron por el Test de Willcoxon; y las variables categóricas, por el Test de Fisher. Además, a las variables categóricas significativas con más de 2 categorías se les realizó el Test de Independencia de Pairwise.

Luego se calculó la tasa de incidencia o densidad de incidencia (DI) para evaluar la probabilidad de recambio entre las recurrencias en una determinada característica a través de un periodo de tiempo. Para este objetivo, se evaluó los cambios en la presencia de síntomas (asintomáticos/sintomáticos) y el genotipo de las recurrencias

con la infección inicial (homologo/heterólogo) bajo los siguientes supuestos: cambios únicos de un tipo a otro (Ejemplo: sintomático → asintomático), cambios mixtos entre los episodios (Ejemplo: Sintomático → Asintomático → Sintomático → Asintomático) y casos donde no se presentaron cambios entre los episodios (Ejemplo: Heterólogo → Heterólogo → Heterólogo). Este índice o densidad de incidencia se calculó a través del cociente entre el número de nuevos casos (número de casos de cada escenario evaluado) y el número total de personas – año en riesgo. Este valor total de personas – año en riesgo 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. Además, para la evaluación de la tasa de recambio en ambas características, también se evaluó el tiempo de sobrevivencia de una recurrencia al cambio por medio de las curvas de Kaplan – Meier.

Por otro lado, se aplicó el análisis de riesgo de Nelson-Aalen para determinar la probabilidad de presentar una recurrencia asintomática o sintomática en el tiempo. Para este análisis, se tomó en cuenta el tiempo desde el D0 de cada infección identificada en los individuos; por consiguiente, durante este análisis los participantes sin recurrencias serán considerados como censurados, ya que no sufrieron el evento. La comparación entre las curvas de riesgo se analizó con el Test de Log-Rank. Finalmente se realizaron los análisis de regresión de Riesgo Proporcional COX (COX PH) para la última recurrencia y la regresión de Proceso de Recuento COX (COX CP) para todas las recurrencias (59), con el fin de analizar los factores que estén asociados a las recurrencias asintomáticas (grupo de interés) y sintomáticas (grupo control). Para este análisis también se consideró el tiempo inicial desde la primera intervención positiva a *Plasmodium vivax* o D0 y se censuraron a los individuos que no presentaron recurrencias. A través del análisis univariado en ambas regresiones, se evaluaron las siguientes características del parásito y el hospedero: densidad parasitaria en el D0, el estatus de diagnóstico en el D0, sexo, edad, área de estudio, multiplicidad de infección en el D0, variabilidad haplotídica entre los episodios y escenarios de evolución de la variabilidad haplotídica entre los episodios recurrentes. Las variables que obtuvieron un valor de p inferior a 0.2 fueron incluidas al análisis de multivariado.

Tabla N°2: Análisis realizados según cada objetivo específico.

OBJETIVO ESPECIFICO	ANÁLISIS
1. Descripción de la infección inicial y las recurrencias clasificadas por presencia o no presencia de síntomas.	Pruebas de asociación: Test de Fisher (variables categóricas) y test de Willcoxon (variables continuas)
2. Determinar la tasa de recambio sintomático/asintomático (o viceversa) a lo largo del estudio.	Densidad de incidencia: según presencia de síntomas. Análisis de supervivencia: Curva de Kaplan-Meier.
3. Determinar el riesgo de experimentar una recurrencia asintomática o sintomática y estimar su tiempo de aparición.	Análisis de riesgo: Curva de Nelson – Aalen.
4. Identificar los factores del parásito y del hospedero asociados a experimentar recurrencias asintomáticas y sintomáticas.	Análisis de asociación: COX-Proportional hazard (ultima recurrencia) y COX- Counting Process (todas las recurrencias)
5. Evaluar la evolución de la diversidad intra-hospedero a lo largo del tiempo determinando la densidad de incidencia de los episodios recurrentes.	Densidad de incidencia: según presencia de síntomas. Análisis de supervivencia: Curva de Kaplan-Meier.

V.5 Consideraciones Éticas:

Este estudio fue exonerado por el Comité Institucional de Ética en Investigación en Humanos (DUICT) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia bajo el código SIDISI 206626. La data fue obtenida a través del proyecto “PVIVAX-UPCH”, que fue aprobado por la DUICT y que se presenta bajo el código SIDISI 53256.

VI. RESULTADOS

VI.1 Características basales de la población y sus infecciones recurrentes.

Las características basales de la población y sus infecciones iniciales se evaluaron a partir de los 302 individuos que pertenecieron a las 29 comunidades que formaron parte del estudio (Tabla N°3).

Tabla N°3: Características basales de los participantes del estudio agrupados por áreas de estudio.

	A1		A2		A3		A4		Test de Fisher (p-value)	Total (%)
	n	%	n	%	n	%	n	%		
N° de personas	112	37.1	70	23.2	63	20.86	57	18.9		302
Sexo									0.852	
Femenino	54	48.2	35	50.0	27	42.9	28	49.1		144 (48%)
Masculino	58	51.8	35	50.0	36	57.1	29	50.9	158 (52%)	
Edad									0.216	
Menores de 5 años	15	13.4	7	10.0	5	7.9	7	12.3		34 (11%)
6 a 15 años	44	39.3	16	22.9	19	30.2	18	31.6		97 (32%)
16 a 60 años	44	39.3	44	62.9	35	55.5	30	52.6		153 (51%)
Mayores de 60 años	9	8.0	3	4.3	4	6.3	2	3.5	18 (6%)	
Fiebre D0									0.405	
Si	75	67.0	50	71.4	39	61.9	43	75.4		207 (69%)
No	37	33.0	20	28.6	24	38.1	14	24.6	95 (31%)	
¿Episodios de recurrencias?									0.611	
No	41	36.6	24	34.3	23	36.5	16	28.1		104 (34%)
Si	71	63.4	46	65.7	40	63.5	41	71.9	198 (66%)	

El Test de Fisher evalúa si la distribución de las características son similares en cada área de estudio. Ninguna característica tuvo una diferencia significativa entre las áreas. Los porcentajes de cada característica se calcularon a partir de la población que conforma cada área de estudio, mientras que los porcentajes del número de personas de cada área se calculó a partir del total (n=302 individuos).

Los resultados describen que, entre las áreas de estudio la distribución de individuos no fue equitativa, ya que en A1 fue donde se obtuvo el mayor (37% del total) y en A4 el menor número de individuos (18.8% del total). Por otro lado, respecto a las características evaluadas no se encontró ninguna diferencia estadística significativa de estas entre las áreas de estudio. Lo que si destaca en el total de los individuos evaluados es que según grupo etario la población menos de 5 años (n=34/302) y el grupo de niños

de 6 a 15 años (n=97/302) suman el 43% del total de individuos, comparado al 51% del grupo etario más frecuente que fueron los individuos de 16 a 60 años (n=153/302). También se observa que fue mayor el porcentaje de individuos que presentaron fiebre el día de su primera intervención o D0 (69% del total). Esto refleja que para el día de la primera intervención de cada individuo, en todas las áreas se registró que las infecciones eran mayormente sintomáticas. Finalmente, de los 302 participantes evaluados, 198 personas presentaron al menos un episodio recurrente, siendo esta la población principalmente evaluada en este trabajo (Tabla N°3) (Figura n°6).

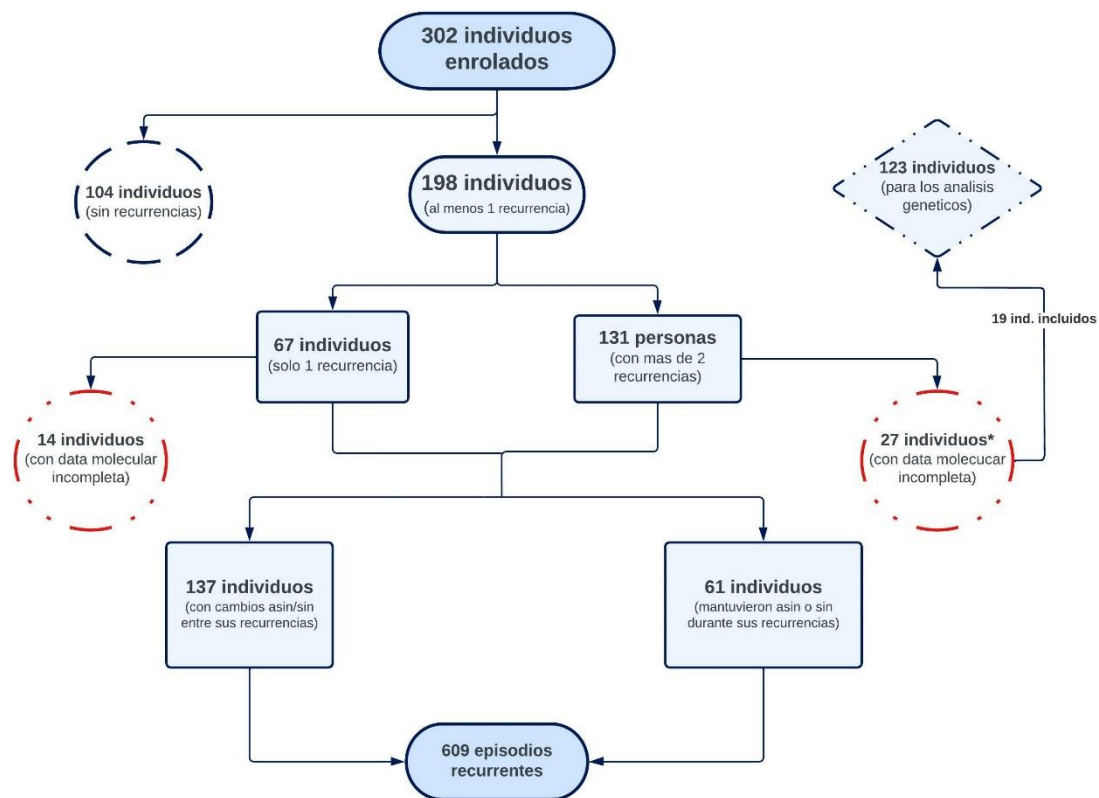


Figura N°6: Flujograma sobre la selección y caracterización de los individuos enrolados en los análisis

1. De los 27 individuos con más de dos recurrencias con data molecular incompleta; 8 individuos no presentaron ninguna información entre sus recurrencias, mientras que 19 sí presentaron alguna información y a estos individuos sí se los incluyó en los análisis, evaluando a un total de **123 individuos** solo en los casos de análisis genéticos. 2. Para la evaluación de la evolución de síntomas en las recurrencias se consideró solo a los **137 individuos** que presentaron cambios entre sus episodios. 3. Finalmente, para las curvas de riesgo se consideró a los **302 individuos** enrolados (debido a que todos presentaron información sintomatológica), siendo el grupo de 104 individuos sin recurrencias los considerados como casos censurados.

En el siguiente flujograma se muestra como se ha distribuido a los individuos según la información que estos aportan en el estudio. A partir de las 198 personas que presentaron recurrencias, se reportaron 609 episodios recurrentes a lo largo del estudio

(Tabla N°4). De estos individuos se registró que 67 personas (34%) presentaron solo una recurrencia, mientras que 131 (66%) tuvieron recurrencias múltiples (ratio: 1:2) (Figura N°6) (Tabla N°4). Respecto a su distribución en las áreas; el mayor porcentaje de recurrencias únicas se dio dentro de A3, con un 42.5% (n=17) del total de participantes en el área de estudio. Mientras que el área con mayor porcentaje de recurrencias múltiples fue A4, presentándose en un 83% (n=34) de sus participantes. Finalmente, fue en A4 y A1 (áreas más aisladas) donde se presentó el mayor número de individuos que tuvieron más de 6 episodios recurrentes, áreas donde se registraron hasta 11 recurrencias por persona.

Tabla N° 4: Número de participantes con recurrencias por *P. vivax* agrupados por áreas de estudio.

	A1		A2		A3		A4		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%		
N° de recurrencias	201	33.0	131	21.5	92	15.1	185	30.4	609	
N° de personas evaluadas	112	37.1	70	23.2	63	10.6	57	18.9	302	
Personas con infecciones recurrentes										
Solo 1 recurrencia	29	40.8	14	30.4	17	42.5	7	20.7	67 (34%)	
2 o más recurrencias	De 2 a 5 episodios	32	76.2	27	84.4	22	95.7	21	61.8	102 (78%)
	Más de 6 episodios	10	23.8	5	15.6	1	4.3	13	38.2	29(12%)
	Total	42	59.2	32	69.9	23	57.5	34	82.9	131 (66%)
Total	71	35.5	46	23.2	40	20.2	41	20.7	198	

Se describe el número de personas que sufrieron recurrencias (únicas y múltiples) por áreas de estudio. Los porcentajes para las categorías dentro de más de 2 recurrencias (De 2 a 5 recurrencias y más de 6 recurrencias) se calcularon según el total de recurrencias múltiples por área de estudio. 198 fueron las personas que sufrieron al menos 1 episodio recurrente

VI.2 Caracterización de las recurrencias según la presencia de síntomas.

VI.2.1 Características de la infección inicial (D0) de cada participante:

Se caracterizó las infecciones del D0 de cada participante (Tabla N°5). De estas, 95 fueron asintomáticas y 207 sintomáticas. Respecto a las infecciones asintomáticas, estas presentaron una densidad parasitaria menor de trofozoítos (mediana = 2100 p/μl [RIQ: 3222.5]) en comparación a las infecciones sintomáticas (mediana = 3971 p/μl [RIQ: 4413.5]) (Test de Willcoxon, $p < 0.001$, $r = 0.3$). Al categorizar la parasitemia, las infecciones iniciales presentaron en su mayoría densidades mayores a 1000 p/μl,

representando un 64.2 % de las infecciones iniciales asintomáticas y un 85.1% de las sintomáticas. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas cuando los participantes fueron agrupados por edad, presencia de gametocitos, estatus de diagnóstico y MOI (Tabla N°5).

Tabla N°5: Características de las infecciones detectadas previas al tratamiento (D0) agrupadas según la presencia de síntomas.

		Asintomáticos		Sintomáticos			
		Mediana	RIQ	Media	RIQ	P-value (Test de Wilcoxon)	
Densidad parasitaria trofozoítos (log10 para P-value)		2100	3222.5	3971	4413.5	<0.001, r=0.3	
Densidad de gametocitos (log10 para p-value)		72	248	107	334.5	0.583	
		Asintomáticos		Sintomáticos			
FACTOR		N=95	%	N=207	%	Total	P-value (Test de Fisher)
Densidad Parasitaria (Trofozoítos/u)	Menor a 100 (a)	10	10.5	9	4.3	19	<0.001
	101 - 1000 (a)	24	25.3	22	10.6	46	
	Mayor a 1000 (b)	61	64.2	176	85.1	237	
Presencia de Gametocitos (Gametocitos/u)	Negativo	72	75.8	151	72.9	223	0.673
	Positivo	23	24.2	56	27.1	79	
Multiplicidad de infección (MOI)	Monoclonal	57	63.3	129	64.2	186	0.896
	Policlonal	33	36.7	72	35.8	105	
Detección por microscopía	Microscópicos	94	98.9	207	100	301	0.315
	Submicroscópicos	1	1.1	0	0.0	1	
Área de estudio	A1	37	39.0	75	36.2	112	0.405
	A2	20	21.0	50	24.2	70	
	A3	24	25.3	39	18.8	63	
	A4	14	14.7	43	20.8	57	
Edad	Menor de 5 años	8	8.4	26	12.6	34	0.779
	6 a 15 años	31	32.6	66	31.9	97	
	16 a 59 años	50	52.6	103	49.7	153	
	Mayores de 60 años	6	6.4	12	5.8	18	

Las variables continuas estuvieron transformadas en log10 para el Test de Wilcoxon, análisis para variables no paramétricas. El valor de r representa el tamaño del efecto observado ($r= 0.3$, efecto medio). La variable categórica de densidad parasitaria está conformada en parásitos/ μ l, los tres grupos se categorizaron como distintos al compararlos con el Pairwise Nominal Confidence test. RIQ: rango Intercuantiles. Para el análisis de MOI se consideró un n menor debido a que no se obtuvo información de los genotipos para algunas muestras; Asintomáticos=90 infecciones y Sintomáticos= 201 infecciones.

VI.2.2 Características de las recurrencias:

Se registraron 609 recurrencias, de las cuales 398 fueron asintomáticas y 211 sintomáticas (ratio: 1.9:1) (Tabla N°6). Sin embargo, hubo 67 recurrencias que no amplificaron al evaluarse con los 14 MS y estas no serán consideradas en los análisis que correspondan a las características genéticas. Al igual que las infecciones iniciales, las recurrencias con mayor densidad parasitaria fueron las infecciones sintomáticas (mediana= 2376 p/μl, [RIQ: 4066.4]), mientras que las recurrencias asintomáticas presentaron densidades más bajas (mediana = 385 p/μl, [RIQ: 2571.3]) (Test de Willcoxon: $p < 0.001$, $r=0.76$). Debido a esto, las recurrencias con densidades menores a 100 parásitos/μl representaron el 91% ($n=366/398$) de las recurrencias asintomáticas; en contraste con las recurrencias sintomáticas donde las infecciones con densidades mayores a 1000 p/μl representaron el 55.9% ($n=118/211$). Al evaluar la densidad de gametocitos y su presencia en las infecciones recurrentes, presentaron gametocitos solo 6 recurrencias asintomáticas (1.5% de 398 rec.), a diferencia de las 46 recurrencias sintomáticas (21.8% de 211 rec.) con gametocitos (Test de Fisher, $p<0.001$). Sin embargo, el nivel de densidad promedio de gametocitos encontrados en las infecciones asintomáticas fueron más altas (mediana = 52 p/μl, [RIQ: 218]) (Test de Willcoxon: $p<0.001$, $r=0.36$) (Tabla N°6).

Luego se evaluó las diferencias en el tiempo de aparición entre las recurrencias asintomáticas y sintomáticas. La mediana de tiempo de aparición para una recurrencia asintomática fue de 302 días [RIQ: 278.23 días], mientras que la mediana de tiempo de aparición de una recurrencia sintomática fue de 232 días [RIQ: 298 días]. Al categorizar el tiempo, se observa que un 73.4% ($n=292/398$) de las recurrencias asintomáticas aparecieron después de los 180 días; mientras que solo apareció una recurrencia asintomática antes de los primeros 30 días. Por otro lado, las recurrencias sintomáticas tuvieron una aparición más temprana, presentándose un 41.7% ($n=88/211$) antes de los 180 días. El tiempo de aparición distribuido entre las categorías de tiempo fue diferente entre las infecciones asintomáticas y sintomáticas (Test de Willcoxon: $p<0.001$, $r=0.17$) (Tabla N°6).

Tabla N°6: Características de las recurrencias por *P. vivax* agrupadas según presencia de síntomas

		Asintomáticas		Sintomáticas			
		Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	P-value (Test de Wilcoxon)	
Densidad parasitaria trofozoítos log10[parásitos/uL]		385	2571.3	2376	4066.5	<0.001, r=0.76	
Densidad de gametocitos (log10 para p-value)		52	218	16	65.5	<0.001, r=0.36	
Tiempo de aparición (días)		301.5	278.25	232	298	<0.001, r=0.17	
		Asintomáticas		Sintomáticas			
FACTOR		398	%	211	%	Total	P-value (Test de Fisher)
Densidad Parasitaria (trofozoítos/ul)	Menor de 100 (a)	366	91.0	51	24.2	417	<0.001
	101 - 1000 (b)	14	3.5	42	19.9	56	
	Mayor a 1000 (b)	18	4.5	118	55.9	136	
Presencia de Gametocitos (Gametocitos/ul)	Negativo	392	98.5	165	78.2	557	<0.001
	Positivo	6	1.5	46	21.8	52	
Tiempo de aparición (días)	< 30 días (a)	1	0.3	12	5.7	13	<0.001
	30 - 90 días (b)	40	10.1	38	18.0	78	
	90 - 180 días (bc)	63	15.8	38	18.0	101	
	> 180 días (c)	292	73.4	123	58.3	415	
Estatus de detección	Microscópicos	44	11.1	186	88.2	230	<0.001
	Submicroscópicos	354	88.9	25	11.8	379	
Edad	Menores de 5 años (a)	36	9.0	38	18.0	74	0.0105
	6 a 15 años (b)	135	34.0	72	34.1	207	
	16 a 60 años (b)	194	48.7	89	42.2	283	
	Mayores de 60 años (b)	33	8.3	12	5.7	45	
Multiplicidad de infección (MOI)	Monoclonal	280	73.9	136	67.7	416	0.122
	Policlonal	99	26.1	65	32.3	164	
Comparación de genotipos con D0	Homóloga	78	22.4	38	19.7	116	0.291
	Heteróloga	271	77.6	155	80.3	426	

Las variables continuas estuvieron transformadas en log10 para el Test de Wilcoxon, análisis para variables no paramétricas. El valor de r representa el tamaño del efecto observado: r=0.76, efecto alto; r=0.36, efecto medio; r=0.17, efecto bajo. El total de recurrencias que obtuvieron un valor MOI fue 580 (Asin=379 y Sin=201 recurrencias). El total de recurrencias que obtuvieron valor en la comparación de genotipos fueron 542 (Asin=349 y Sin=193 recurrencias). Evaluación de Pairwise Nominal Confidence test.

Respecto al estatus de detección, las infecciones submicroscópicas representan el 88.9% (n= 354/398) del total de recurrencias asintomáticas y solo el 11.8% (n= 25/211) de las recurrencias sintomáticas (Test de Fisher, $p < 0.001$). Según la edad; solo el grupo de individuos menores de 5 años tuvo un mayor número de recurrencias sintomáticas, representando más del 51% (n= 38/74) del total. Para los otros grupos etarios; los porcentajes de recurrencias asintomáticas fueron mayores. Finalmente, no se encontró diferencias significativas entre los grupos de recurrencias asintomáticas y sintomáticas al evaluar la multiplicidad de infección (MOI) y la comparación de genotipos con D0; sin embargo, se observa que para ambos grupos fue mayor el número de recurrencias monoclonales y heterólogas (Tabla N°6).

VI.2.3 Distribución de las recurrencias asintomáticas y sintomáticas por área de estudio:

Se evaluó las proporciones de la última y todo el conjunto de recurrencias asintomáticas y sintomáticas registradas en las 198 personas que presentaron estos episodios (Tabla N°7). Para ambos grupos, se observa que en todas las áreas la proporción de recurrencias asintomáticas era mayor. Sin embargo, al evaluar todo el conjunto de recurrencias, se observa diferencias significativas entre las áreas al presentar A1 un ratio alto de 2.9:1 (Asin/Sin) y A2 un ratio bajo de 1.3:1 (Asin/Sin) (Test de Fisher, $p = 0.0019$). En las comunidades ribereñas de A1 y A4 existió una proporción más alta de recurrencias asintomáticas durante la aparición de los episodios recurrentes, las cuales presentaron hasta más de 10 recurrencias por participante (Anexo N°2). En general, los porcentajes de recurrencias más altos se presentaron en A1 con un 33% (n=201/609) y en A4 con un 30% (n=185/609), siendo además ambas áreas consideradas como las más aisladas (Tabla N°7).

Tabla N°7: Proporción de las infecciones recurrentes asintomáticas y sintomáticas agrupadas según área de estudio.

Área de estudio		Ratio (Asin/Sin)	Asintomático (%)	Sintomático (%)	N°	P-valor (Test de Fisher)
Última recurrencia	A1	3.2	76	24	71	0.142
	A2	2.1	67	33	46	
	A3	3	75	25	40	
	A4	1.3	56	44	41	
A1		2.9	74	26	201	0.0019

Todas las recurrencias	A2	1.3	56	44	131
	A3	2.3	70	30	92
	A4	1.5	61	39	185

VI.3 Evolución de la presencia de síntomas en las infecciones recurrentes por *Plasmodium vivax*:

VI.3.1 Análisis de riesgo según presencia de síntomas:

Se realizó el análisis que evalúa la probabilidad de riesgo de que una infección sea asintomática o sintomática en el tiempo, considerando en el análisis a todas las infecciones (infecciones iniciales + recurrencias) y de solo la última recurrencia de cada individuo (Figura N°7). Se observa que la probabilidad de riesgo de que un episodio sea sintomático es mayor a que sea asintomático a través del tiempo al evaluar todas las infecciones (long-rank: $p < 0.001$) (Figura 7.A); sin embargo, no se observó esta diferencia en el análisis de riesgo del último episodio, lo que refleja que la diferencia en los riesgos no permanece hasta la última recurrencia y que presenta más influencia por los primeros episodios (long-rank: $p = 0.4$) (Figura 7.B). Según el primer análisis, solo un 2% de las infecciones asintomáticas se dieron durante los primeros 30 días de evaluación, el 4.5% de los casos para los 90 días (3 meses) y casi el 20% para los 180 días (6 meses), dándose el 50% de las infecciones asintomáticas todavía hasta los 392 días (13 meses).

Al considerar a las infecciones sintomáticas, un 3% de los casos se dieron para los primeros 30 días, el 14% de los casos para los 90 días (3 meses) y casi un 35 % para los 180 días (6 meses), dándose el 50% de las infecciones sintomáticas para los 292 días (10 meses); por consiguiente, las infecciones sintomáticas aparecieron en general de manera más rápida, provocando un mayor riesgo de aparición a través del tiempo (Figura N°7.A) (Anexo N°3).

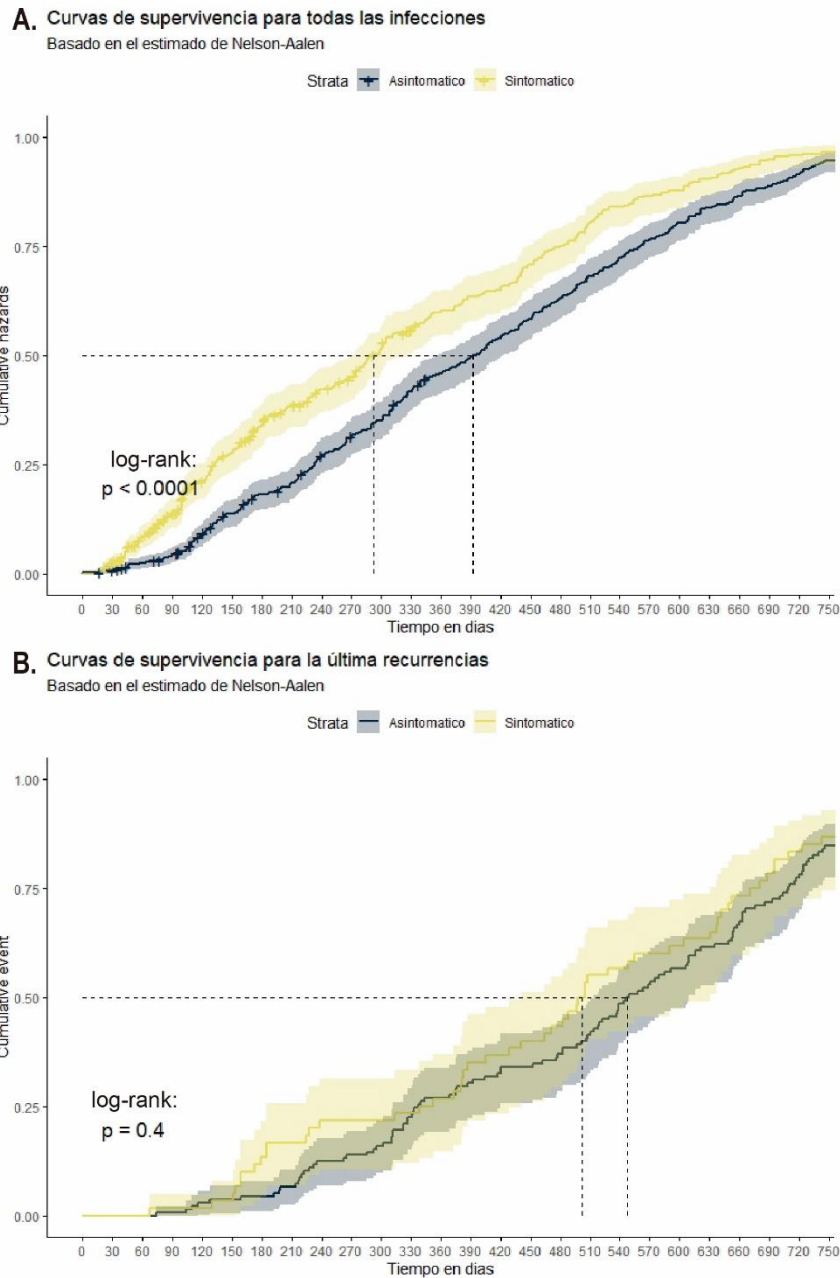


Figura N°7: Curvas de riesgo a infecciones asintomáticas y sintomáticas

A. Curva de riesgo de Nelson-Aalen a presentar síntomas o no para todas las infecciones. **B.** Curva de riesgo de Nelson-Aalen a presentar síntomas o no para las últimas recurrencias. Análisis de diferenciación de riesgos se realizó mediante el test de long-rank.

VI.3.2 Evaluación del cambio en la presencia de síntomas a través del tiempo.

Se presenta una línea del tiempo de los cambios realizados a través de las recurrencias en el estatus sintomatológico de los 198 individuos que presentaron al menos un episodio recurrente (Figura N°8). Al contabilizar las infecciones según el año de

estudio, durante el 2008 se observó una proporción similar entre las recurrencias sintomáticas y asintomáticas (ratio: 1.1:1 sinto/asinto). Esta situación cambia durante los siguientes años, al presentarse una mayor proporción de recurrencias asintomáticas para el año 2009 (ratio: 1.87:1; asinto/sinto) y 2010 (ratio: 2.6:1; asinto/sinto). Además, a partir de esta línea del tiempo se puede observar el recambio en la presencia de síntomas a lo largo del tiempo. De esta manera, de los 198 individuos evaluados, se registró que 137 personas (69%) presentaron recurrencias con cambios en la presencia de síntomas a través del tiempo de evaluación, el resto de individuos no presentaron cambios a lo largo de sus recurrencias, siendo 36 individuos (18%) los que permanecieron como asintomáticos y 25 individuos (13%) como sintomáticos durante todos sus episodios recurrentes (Figura N°6).

VI.3.3 Evaluación de la densidad de incidencia de los escenarios de cambio en el estatus sintomatológico (sintomático/asintomático).

Para evaluar la evolución de las infecciones según presencia de síntomas, se tomó en cuenta a las 137 personas que presentaron cambios en los síntomas a través de sus recurrencias. Para esto se consideró 3 escenarios (Figura N° 9):

1. Participante con episodios sintomáticos evoluciona a una recurrencia asintomática (Sintomático → Asintomático)
2. Participante con episodios asintomáticos evoluciona a una recurrencia sintomática (Asintomático → Sintomático)
3. Participante que presenta una evolución mixta entre recurrencias asintomáticas y sintomáticas (Ejemplo: Sintomática → Asintomática → Sintomática → Asintomática).

Para cada uno de estos escenarios, se calculó la densidad de incidencia (DI), con el que se obtuvo un total de 212.3 personas – años al considerar a los 198 individuos que desarrollaron al menos una recurrencia. Este valor se considerará para todos los análisis de densidad de incidencia que se realizaran durante el estudio. La densidad de incidencia para el tercer escenario es de 24.5 nuevos casos cada 100 personas – año,

escenario que describe a los individuos que tuvieron cambios múltiples en la presencia de síntomas entre sus recurrencias (Figura N°9).

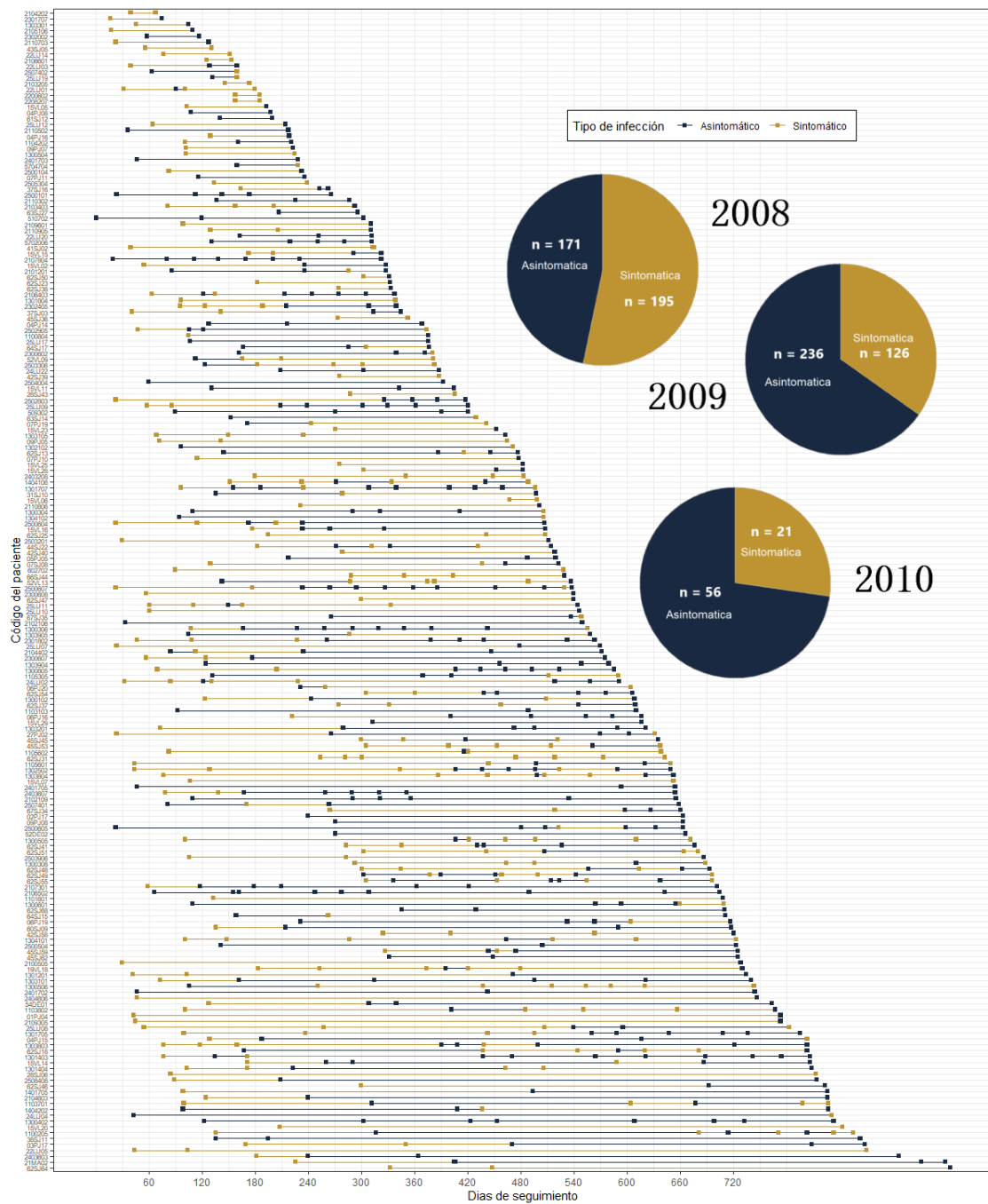


Figura N° 8: Presencia de síntomas durante el estudio

Línea del tiempo sobre el desarrollo de las recurrencias por individuo según la sintomatología (Asintomáticos/Sintomáticos). Los individuos están ordenados según el tiempo de aparición de la última recurrencia en orden ascendente. “n” representa el número de recurrencias.

Por otro lado, al considerar los cambios únicos, la densidad de incidencia o tasa de cambio del primer escenario (la evolución de una infección sintomática a una asintomática) es 32.5 nuevos casos por cada 100 personas – año de seguimiento. Por último, la densidad de incidencia del segundo escenario (evolución de una infección asintomática a una sintomática) es 7.5 nuevos casos por cada 100 personas – año de seguimiento. En síntesis, estos valores reflejan la tendencia que tienen las recurrencias a ser asintomáticas, ya que el primer escenario fue el más frecuente entre los individuos, presentándose en 69 participantes (50%) de los 137 individuos que llegaron a presentar algún cambio en la presencia de síntomas entre sus recurrencias (Figura N°9).

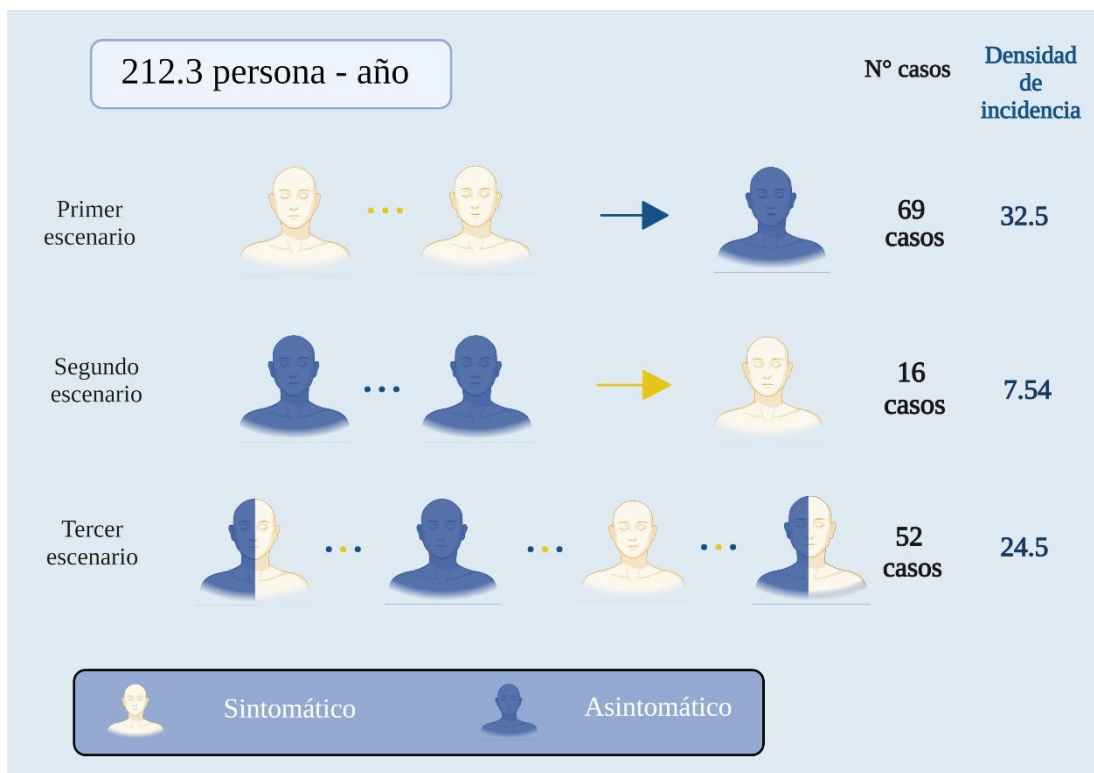


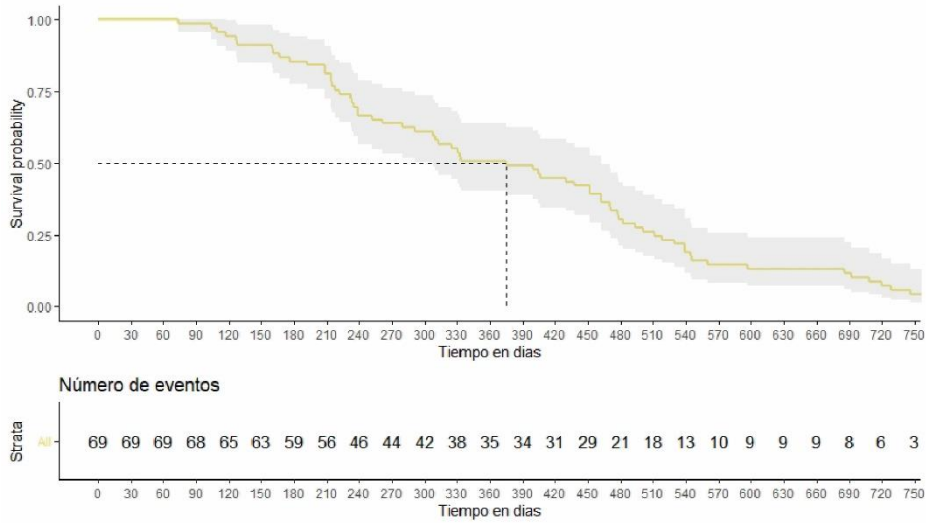
Figura N° 9: Diagrama de los escenarios de evolución de las infecciones según presencia de síntomas.

Fueron 137 individuos los que presentaron cambios en la presencia de síntomas entre sus episodios recurrentes. La densidad de incidencia se presenta por cada 100 personas – año. No se consideró a los supuestos donde las recurrencias permanecieron como sintomáticas y asintomáticas a través del tiempo. Se presenta en amarillo: episodios sintomáticos y en azul: episodios asintomáticos; los individuos con ambos colores representan una sintomatología inespecífica.

A continuación, para estimar el tiempo promedio de cambio para el primer (Sintomático → Asintomático) y segundo escenario (Asintomático → Sintomático) se

realizó el análisis de supervivencia Kaplan – Meier. El análisis mostro que la mediana de tiempo para que una infección sintomática cambie a una recurrencia asintomática es de 375 días [IC: 308 – 462 días] (Figura N°10.A). Mientras que la mediana de tiempo para que una infección asintomática cambie a una sintomática es de 380 días [IC: 243 – 511 días] (Figura N°10.B). A pesar de que los tiempos donde el 50% de las recurrencias que aún permanecen sin cambiar sean cercanos para ambos escenarios, los cambios de sintomáticos a asintomáticos se dan a partir de los 90 días (3 meses), permaneciendo aun libres de cambio un 85% de las recurrencias para los 180 días (6 meses). Por otro lado, los cambios de asintomáticos a sintomáticos se empiezan a dar recién a partir de los 150 días (5 meses), permaneciendo un 75% de las recurrencias libres de cambio para el día 180 (6 meses) (Anexo N°3). Fueron menos los eventos en los que una recurrencia asintomática cambia a sintomática y estos se daban entre periodos más largos de tiempo.

A. Curvas de supervivencia: Sintomáticos a asintomáticos
Basado en el estimado de Kaplan-Meier



B. Curvas de supervivencia: Asintomáticos a sintomáticos
Basado en el estimado de Kaplan-Meier

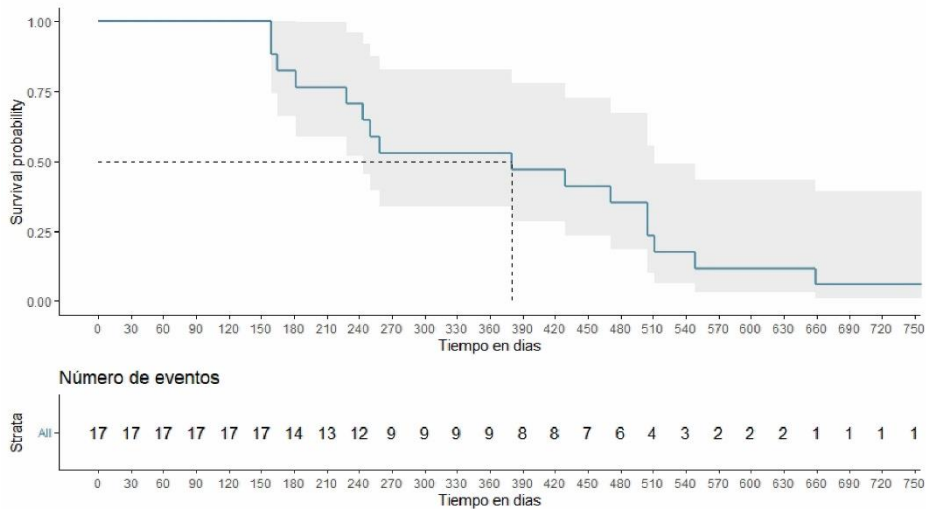


Figura N° 10: Curva de supervivencia a cambios según presencia de síntomas

A. Probabilidad de Kaplan – Meier a que la infección permanezca libre de evolucionar de ser sintomática a asintomática. **B.** Probabilidad de Kaplan-Meier a que la infección permanezca libre de evolucionar de ser asintomática a sintomática. Para ambos análisis se consideraron solo a los individuos que han sufrido al menos una recurrencia.

VI.4 Evaluación de la evolución genética de las recurrencias a nivel intra-hospedero.

VI.4.1 Evaluación del cambio en la multiplicidad de infección y la variabilidad genética través del tiempo.

Se presentan dos líneas de tiempo donde se puede observar cómo varían los episodios de recurrencia según la multiplicidad de infección (Figura N°11) y la variabilidad genética de las recurrencias comparadas con el D0 (Figura N°12) por cada participante a través de los años. En primer lugar, para la evaluación de la evolución de la multiplicidad de infección a través de las recurrencias, se consideró a los 198 individuos que sufrieron al menos una recurrencia. Se observa que durante el tiempo de estudio se presentaron más recurrencias monoclonales en comparación a las policlonales [ratio de 2.4:1 (Mono/Poli)]. Además, en esta línea del tiempo, se logra distinguir distintos escenarios de cambio a través de los episodios recurrentes entre infecciones monoclonales y policlonales (Figura N°10) (Anexo N°6). Luego se evaluó la línea de tiempo a partir de la evolución de la variabilidad genética entre el D0 y las recurrencias durante los años de estudio. Este análisis muestra que durante el año 2008 se presentó un ratio de 2:1 entre las recurrencias heterólogas y homólogas. La proporción entre estos tipos de recurrencias fue aumentando en favor de las recurrencias heterólogas durante los siguientes años, presentando una ratio de 4.3:1 (Hete/Homo) para el 2009 y una ratio de 22:1 (Hete/Homo) para el 2010. Este resultado mostró que las recurrencias en el tiempo tienden a ser heterólogas con el D0; ya que presentaron 62 casos donde los participantes permanecieron con episodios heterólogos a través de sus recurrencias y 28 casos en el que terminaron cambiando de ser recurrencias homólogas a heterólogas. Esta evolución en las recurrencias se da a nivel de los cambios en los genotipos con el D0, a pesar de que estas recurrencias en su mayoría eran infecciones monoclonales (Figura N°11).

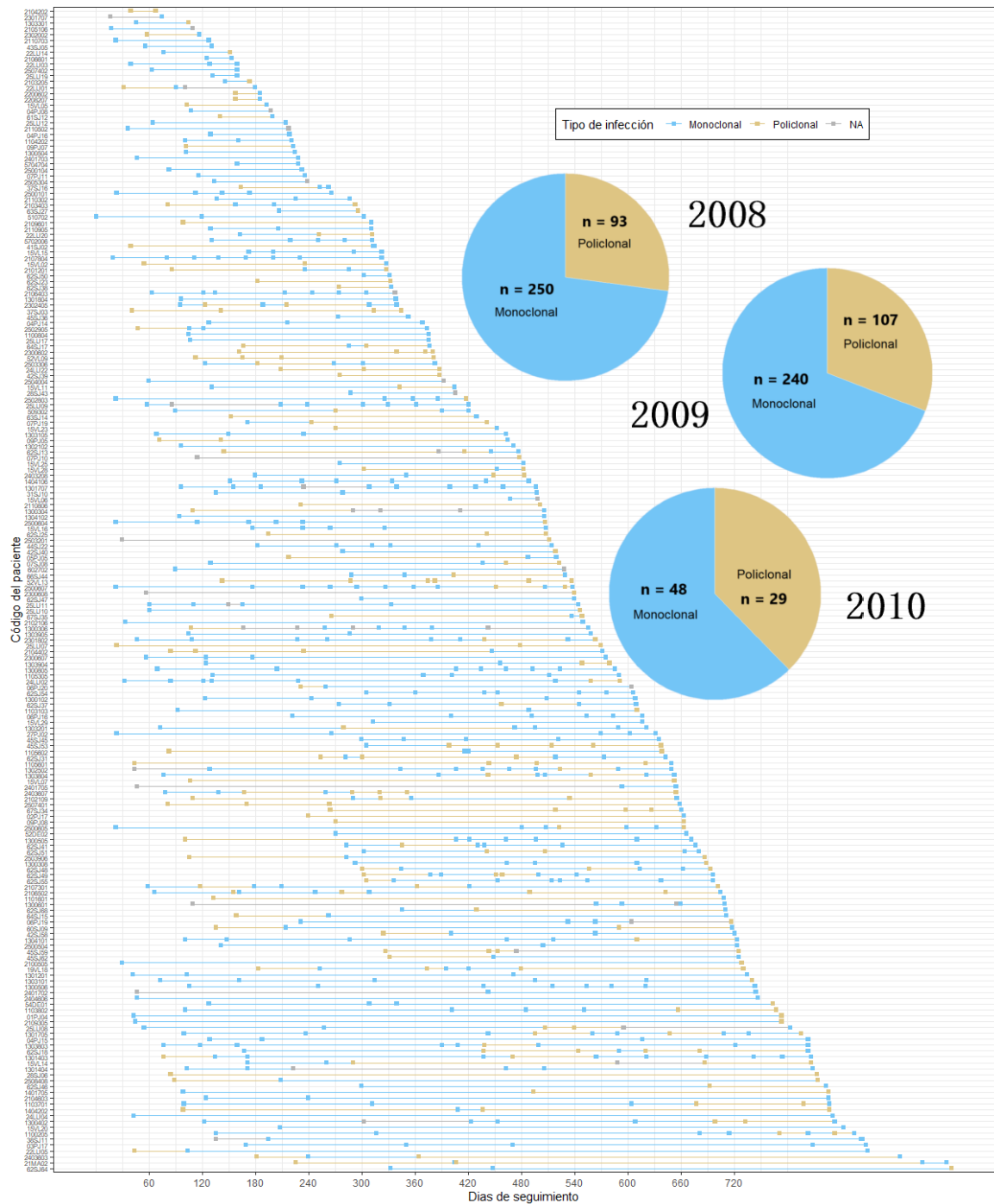


Figura N°11: Evolución en el tiempo de la Multiplicidad de infección (MOI) a través de las recurrencias

Timeline sobre la evolución de la multiplicidad de infección entre los episodios recurrentes por individuo a través de los años del estudio. Las líneas celestes representan a las recurrencias monoclonales, las mostazas a las policlonales y las líneas plomas a las recurrencias que no cuentan con los valores de MOI. Los individuos están ordenados de forma ascendente según el tiempo en el que se dio su último episodio recurrente.

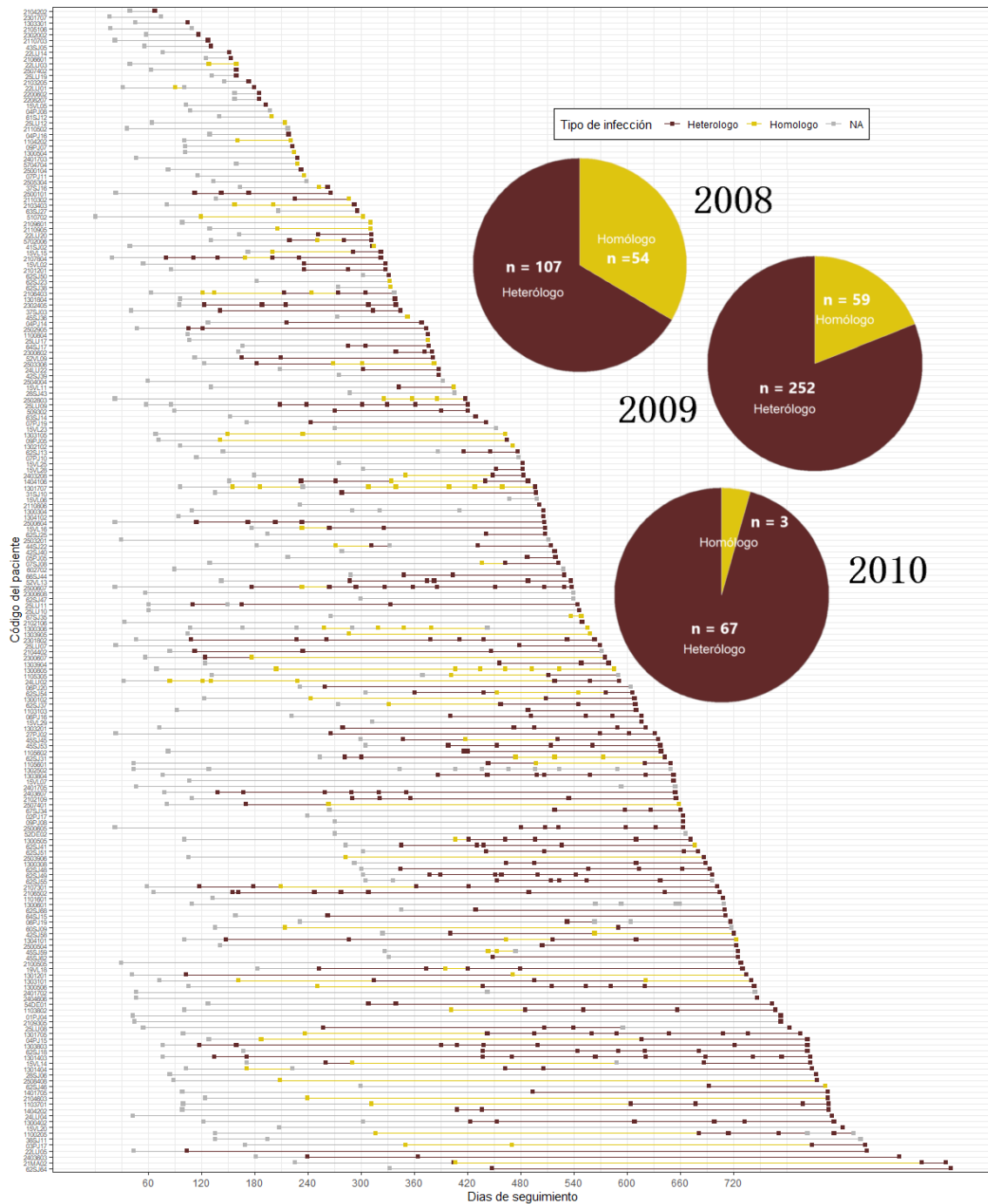


Figura N°12: Evolución en el tiempo de la variabilidad genética a través de las recurrencias

Línea del tiempo sobre la evolución de la variabilidad genética entre los episodios recurrentes por individuo a través de los años del estudio. Las líneas amarillas representan a las recurrencias homólogas con la infección inicial, las rojas a las heterólogas con la infección inicial y las líneas plomas a las recurrencias que no cuentan con los valores de variabilidad genética incluidas las infecciones iniciales. Los individuos están ordenados de forma ascendente según el tiempo en el que se dio su último episodio recurrente.

VI.4.2 Evaluación de la densidad de incidencia en los cambios de genotipos en los episodios recurrentes con el D0.

Para analizar la evolución de los cambios en los genotipos entre los episodios recurrentes se realizó la evaluación de la densidad de incidencia o tasa de recambio. Este análisis considero solo a los participantes que presentaron un número igual o mayor a 2 recurrencias, que en total fueron 131 individuos. Para este análisis, se evaluó cinco posibles escenarios:

1. Participante que solo presentó recurrencias homólogas.
2. Participante que solo presento recurrencias heterólogas.
3. Participante con recurrencias homólogas cambia a recurrencias heterólogas.
4. Participante con recurrencias heterólogas cambia a recurrencias homólogas.
5. Participante con recurrencias mixtas entre homólogas y heterólogas (Ejemplo: Homologo → Heterólogo → Homologo → Heterólogo).

Estos escenarios contemplan cambios únicos, cambios mixtos y permanencia en el estado de cambio de genotipos en las recurrencias (Figura N°12).

Para el primer escenario se presentaron 8 casos y una densidad de incidencia de 3,77 nuevos casos por cada 100 personas – año. Mientras que, para el segundo escenario, donde el individuo solo presentó recurrencias heterólogas, se presentaron 62 casos y la densidad de incidencia fue de 29.20 nuevos casos por cada 100 personas-año; llegando a ser el escenario más frecuente: 50.4% (n=62) de los 123 casos evaluados. Para el tercer escenario, donde un individuo cambia de presentar recurrencias homólogas a heterólogas, se presentaron 28 casos donde la densidad de incidencia fue de 16.01 nuevos casos por cada 100 personas – año. Mientras que, para el cuarto escenario, donde un individuo cambia de presentar recurrencias heterólogas a homólogas, se presentaron solo 7 casos que tuvo una densidad de incidencia de 3.3 nuevos casos por cada 100 personas-año. Finalmente, para el escenario mixto o quinto escenario se reportaron 18 casos que representaron una densidad de incidencia de 8.48 nuevos casos por cada 100 personas-año. En general, las recurrencias en su mayoría permanecían como heterólogas o cambiaban de ser homólogas a heterólogas a través del tiempo de estudio (Figura N° 12).



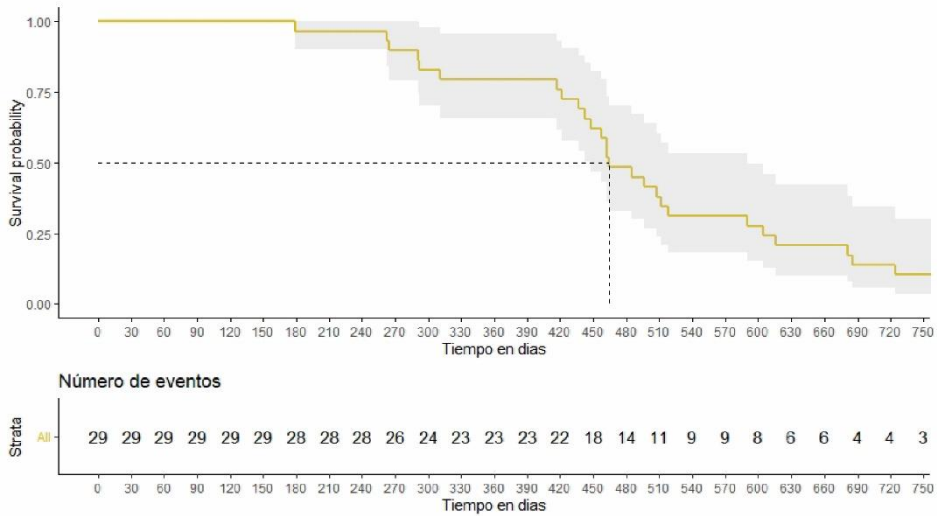
Figura N°13: Diagrama de los escenarios de evolución de las infecciones según variabilidad genética

Fueron 123 los individuos evaluados para variabilidad genética y que presentaron más de dos recurrencias. La densidad de incidencia se presenta por cada 100 personas – año.

Por último, para estimar el tiempo promedio de cambio de una recurrencia homóloga a heteróloga o viceversa, se realizó el análisis de supervivencia Kaplan – Meier (Figura N°13). Mediante este análisis se observa que el tiempo medio para que ocurra el cambio de una recurrencia homóloga a heteróloga fue a los 464 días (15.4 meses) [IC: 448 – 590 días] y que estos eventos se empezaron a dar a partir de los 150 días (Figura 13.A). Mientras que el tiempo medio para que ocurra el cambio de una recurrencia heteróloga a homóloga fue a los 314 días [IC: 270 – 400 días] (10 meses), los cuales aparecieron recién a partir de los 270 días (Figura 13.B).

A. Curvas de supervivencia: Homóloga a heteróloga

Basado en el estimado de Kaplan-Meier



B. Curvas de supervivencia: Heteróloga a homóloga

Basado en el estimado de Kaplan-Meier

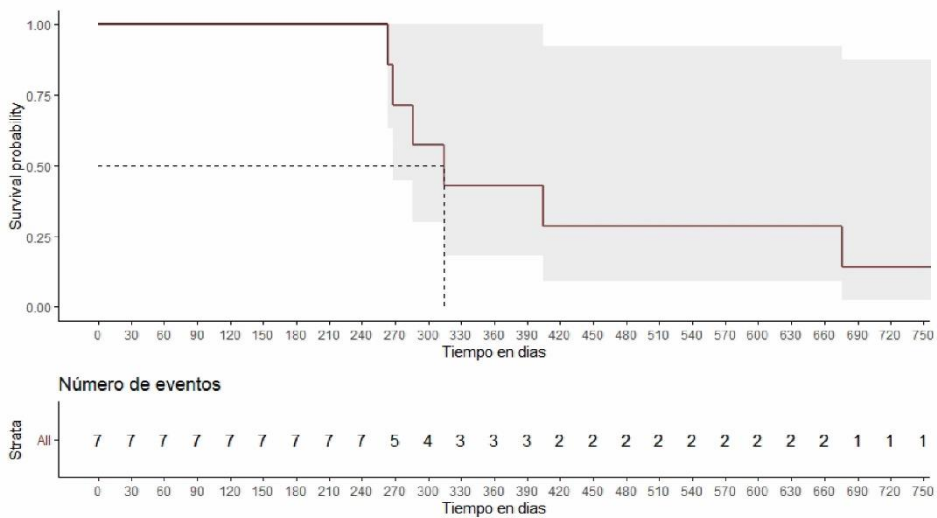


Figura N°14: Curva de supervivencia para cambios según variabilidad genética

A. Probabilidad de Kaplan – Meier a que la infección permanezca libre de evolucionar de ser homóloga a heteróloga (Tercer escenario). **B.** Probabilidad de Kaplan-Meier a que la infección permanezca libre de evolucionar de ser heteróloga a homóloga (Cuarto escenario). Para ambos análisis se consideraron solo a los individuos que han sufrido al menos dos recurrencias.

VI.5 Evaluación de los factores asociados a recurrencias asintomáticas y sintomáticas

Se consideró durante los análisis de factores asociados a las características relacionadas a la infección y el parásito: Multiplicidad de infección en el D0

(monoclonal/policlonal), comparación de genotipos con el D0 (homólogo/heterólogo), presencia de gametocitos en el D0 (negativo/positivo), densidad parasitaria en el D0 (menor a 100 p/μl, de 100 a 1000 p/μl y mayor a 1000 p/μl) y escenarios de cambios en la variabilidad genética hasta el último episodio (escenarios descritos en la Figura N°13). También se evaluaron factores relacionados al individuo: el grupo de edad (menores de 5 años, de 6 a 15 años, de 16 a 60 años y mayores de 60 años), el sexo (femenino/masculino) y área de estudio. Este análisis se realizó para evaluar a los factores predictores que estén asociados a nivel del grupo completo de recurrencias y solo a la última recurrencia de cada participante según presencia de síntomas (asintomáticos y sintomáticos).

A través del análisis univariado de la regresión logística COX-CP con todos los episodios recurrentes registrados en los individuos durante el estudio, se identificó a los factores asociados a recurrencias asintomáticas (Tabla N°8). Ser del **sexo masculino** (HR=1.2 [IC: 1.1 - 1.5], p=0.021) y presentar al menos una **recurrencia homóloga** (HR = 1.7 [IC: 1.3 - 2.2], p<0.001) resultaron factores asociados a riesgo a tener una recurrencia asintomática. El sexo masculino incrementó el riesgo 1.2 veces más que ser del sexo femenino y tener una recurrencia homóloga incrementa el riesgo en 1.7 veces más que las recurrencias heterólogas a través del tiempo, ambas para el desarrollo de una recurrencia asintomática. Además, presentar **una infección policlonal** durante el D0 tuvo una tendencia a ser un factor asociado a protección (HR = 0.83 [IC: 0.68 – 1], p=0.06).

En contraste, al evaluar a los factores asociados al desarrollo de recurrencias sintomáticas, tener una **edad** adulta entre 16 a 60 años (HR=0.55 [IC: 0.4 - 0.74], p<0.001) y pertenecer a **las áreas** A2 (HR= 0.5 [IC:0.37 - 0.67], p<0.001), A3 (HR=0.47 [IC:0.33 - 0.66], p<0.001) y A4 (HR=0.74 [IC:0.56 - 0.99], p=0.043) se presentaron como factores de protección. Además, se observa que tener **de 6 a 15 años** también tiene una tendencia a ser un factor protector (HR=0.73 [IC: 0.53 - 1.01], p=0.055) (Tabla N°8). En resumen, existe un efecto protector en los adultos al presentar un menor riesgo en el tiempo a que sufran una recurrencia sintomática en comparación a los menores de 5 años; del mismo modo, existe un menor riesgo en el

tiempo el pertenecer a las áreas A2, A3 y A4 al compararse con vivir en el área A1 (Figura N°14).

Tabla N°8: Análisis univariado del riesgo de experimentar recurrencias de *P. vivax* utilizando el modelo Cox CP comparando entre infecciones asintomáticas y sintomáticas.

		Análisis univariado para todas las recurrencias				
		Factor	N = 211	HR	P-valor	95% IC
Recurrencias sintomáticas	Densidad Parasitaria en el D0	Menor de 100 p/μl	10	Referencia		
		De 100 a 1000 p/μl	21	1.2	0.534	[0.67 - 2.2]
		Mayor a 1000 p/μl	180	1.3	0.343	[0.77 - 2.1]
	Presencia de gametocitos en el D0	Negativo	151	Referencia		
		Positivo	60	1.1	0.553	[0.85 - 1.4]
	Multiplicidad de infección con el D0	Monoclonal	136	Referencia		
		Policlonal	65	0.9	0.378	[0.72 - 1.1]
	Comparación de genotipos con el D0	Heterólogo	155	Referencia		
		Homólogo	38	1.3	0.198	[0.88 - 1.9]
	Sexo	Femenino	97	Referencia		
		Masculino	114	1.2	0.135	[0.95 - 1.5]
	Edad	Menor de 5 años	38	Referencia		
De 6 a 15 años		70	0.73	0.055	[0.53 - 1.01]	
De 16 a 60 años		91	0.55	<0.001	[0.4 - 0.74]	
Mayor de 60 años		12	1.05	0.858	[0.63-1.75]	
Área de estudio	A1	52	Referencia			
	A2	58	0.5	<0.001	[0.37 - 0.67]	
	A3	28	0.47	<0.001	[0.33 - 0.66]	
	A4	73	0.74	0.043	[0.56 - 0.99]	
		Factor	N = 396	HR	P-valor	95% IC
Recurrencias asintomáticas	Densidad Parasitaria en el D0	Menor de 100 p/μl	36	Referencia		
		100 a 1000 p/μl	55	1.1	0.612	[0.76 - 1.6]
		Mayor a 1000 p/μl	307	1.1	0.398	[0.84 - 1.6]
	Presencia de gametocitos en el D0	Negativo	287	Referencia		
		Positivo	111	0.87	0.196	[0.71 - 1.1]
	Multiplicidad de infección con el D0	Monoclonal	279	Referencia		
		Policlonal	98	0.83	0.06	[0.68 - 1]
	Comparación de genotipos con el D0	Heterólogo	271	Referencia		
		Homólogo	78	1.7	<0.001	[1.3 - 2.2]
	Sexo	Femenino	159	Referencia		
		Masculino	237	1.2	0.021	[1.1 - 1.5]
	Edad	Menor de 5 años	34	Referencia		
De 6 a 15 años		193	1.3	0.15	[0.92 - 1.8]	

	De 16 a 60 años	136	1.1	0.436	[0.83 - 1.5]
	Mayor de 60 años	33	1.3	0.237	[0.84 - 2.0]
Área de estudio	A1	149	Referencia		
	A2	73	0.88	0.325	[0.68 - 1.1]
	A3	62	0.8	0.126	[0.61 - 1.0]
	A4	112	1.07	0.587	[0.84 - 1.3]

Análisis univariado de COX CP (Counting Process), para evaluar a todas las recurrencias. N: representa solo el número de recurrencias. Factor protector: HR<1, Factor de riesgo: HR>1. El número de * representa el grado de significancia. Diferencias significativas: *, p – valor< 0.05; **, p – valor <0.01 y ***, p – valor < 0.001.

También se quiso analizar a los factores asociados a nivel de la última recurrencia presentada por cada individuo durante el estudio, con el propósito de evaluar la permanencia o cambios de estas asociaciones a través del tiempo. En este caso, no se encontró ningún factor asociado al desarrollo de una última recurrencia sintomática (Tabla N°9).

Por otro lado, se encontró una continuidad en la asociación de riesgo que presenta el tener una **recurrencia homóloga** para desarrollar una última recurrencia asintomática, donde las infecciones homólogas incrementan el riesgo en 2.4 veces más que las heterólogas (HR=2.40 [IC: 1.4 - 3.9], p<0.001). Además, al evaluar la asociación de **los escenarios de evolución en los cambios de genotipo** de las recurrencias, se observó que presentar el escenario E2 (HR=0.23 [IC: 0.097 - 0.52], p<0.001), E3 (HR=0.20 [IC: 0.082 - 0.51], p<0.001), E4 (HR=0.25 [IC:0.077 - 0.82], p=0.022) y E5 (HR=0.21 [IC: 0.078 – 0.57], p=0.002) disminuyen el riesgo en el tiempo a presentar una última recurrencia asintomática en comparación al escenario E1, que describe la permanencia de recurrencias homologas en el individuo durante todo el tiempo de evaluación (Tabla N°9). Siendo este último escenario el que describe la permanencia de recurrencias homólogas en el individuo durante todo el tiempo de evaluación. Por último, según el factor **área de estudio**, pertenecer al área A4 disminuye el riesgo en el tiempo a que se produzca una última recurrencia asintomática (HR=0.58 [IC: 0.35 - 0.95], p=0.029) (Figura N°14).

Tabla N° 9: Análisis univariado del riesgo para la última recurrencia utilizando el modelo Cox PH entre asintomáticas y sintomáticas.

		Univariable para ultima recurrencia				
		Factor	N = 60	HR	P valor	95% IC
Recurrencia sintomática	Multiplicidad de infección en el D0	Monoclonal	40	Referencia		
		Policlonal	15	1.1	0.81	[0.82- 2.8]
	Variabilidad genética en comparación con el D0	Heterólogo	42	Referencia		
		Homologo	9	1.7	0.174	[0.8 - 3.5]
	Escenario de evolución de los cambios en los genotipos en las recurrencias	E1	2	Referencia		
		E2	14	0.45	0.318	[0.094 - 2.2]
		E3	10	0.37	0.225	[0.072 - 1.9]
		E4	2	5.14	0.134	[0.604 - 44.2]
		E5	4	0.5	0.445	[0.087 - 2.9]
	Detección por microscopia	Microscópico	48	Referencia		
		Submicroscópico	12	1	0.95	[0.53 - 2]
	Presencia de gametocitos	Negativo	100	Referencia		
		Positivo	36	1.2	0.573	[0.66-2.1]
	Sexo	Femenino	29	Referencia		
Masculino		31	1.1	0.775	[0.65 - 1.8]	
Edad	Menor de 5 años	9	Referencia			
	De 6 a 15 años	20	0.91	0.824	[0.41 - 2]	
	De 16 a 60 años	27	0.76	0.496	[0.35 - 1.7]	
	Mayor de 60 años	4	1.5	0.509	[0.45 - 5]	
Áreas de estudio	A1	17	Referencia			
	A2	15	0.79	0.54	[0.38 - 1.7]	
	A3	10	0.6	0.22	[0.27 - 1.3]	
	A4	18	0.55	0.094	[0.28 - 1.1]	
		Factor	N = 113	HR	P valor	95% IC
Recurrencia asintomática	Multiplicidad Genética	Monoclonal	88	Referencia		
		Policlonal	45	0.79	0.204	[0.55 - 1.1]
	Detección por microscopia	Microscópico	15	Referencia		
		Submicroscópico	123	1.30	0.323	[0.77 - 2.3]
	Presencia de gametocitos	Negativo	125	Referencia		
		Positivo	41	0.56	0.006	[0.37]
	Variabilidad genética en comparación con el D0	Heterólogo	101	Referencia		
		Homologo	19	2.40	<0.001	[1.4 - 3.9]
	Escenario de evolución de los cambios en los genotipos en las recurrencias	E1	6	Referencia		
		E2	48	0.25	0.002	[0.102 - 0.60]
E3		18	0.21	0.001	[0.079 - 0.55]	
E4		5	0.25	0.024	[0.073 - 0.83]	
E5		14	0.21	0.002	[0.078 - 0.57]	
Sexo	Femenino	64	Referencia			

Edad	Masculino	74	1.1	0.712	[0.76 - 1.5]
	Menor a 5 años	11	Referencia		
	De 6 a 15 años	42	1.2	0.662	[0.60 - 2.3]
	De 16 a 60 años	73	1	0.937	[0.54 - 1.9]
	Mayor de 60 años	12	1.3	0.491	[0.59 - 3]
Áreas de estudio	A1	54	Referencia		
	A2	31	0.75	0.209	[0.48 - 1.17]
	A3	30	1.01	0.948	[0.65 - 1.59]
	A4	23	0.58	0.029	[0.35 - 0.95]

Análisis univariado de COX PH (Proporcional Hazard), para evaluar las últimas recurrencias. Factor protector: $HR < 1$, Factor de riesgo: $HR > 1$. 3. Los cambios a nivel de variabilidad genética son los que se dieron a través de los episodios recurrentes previos a la última recurrencia, la variabilidad genética de cada recurrencia es el resultado de la comparación del genotipo la infección inicial.

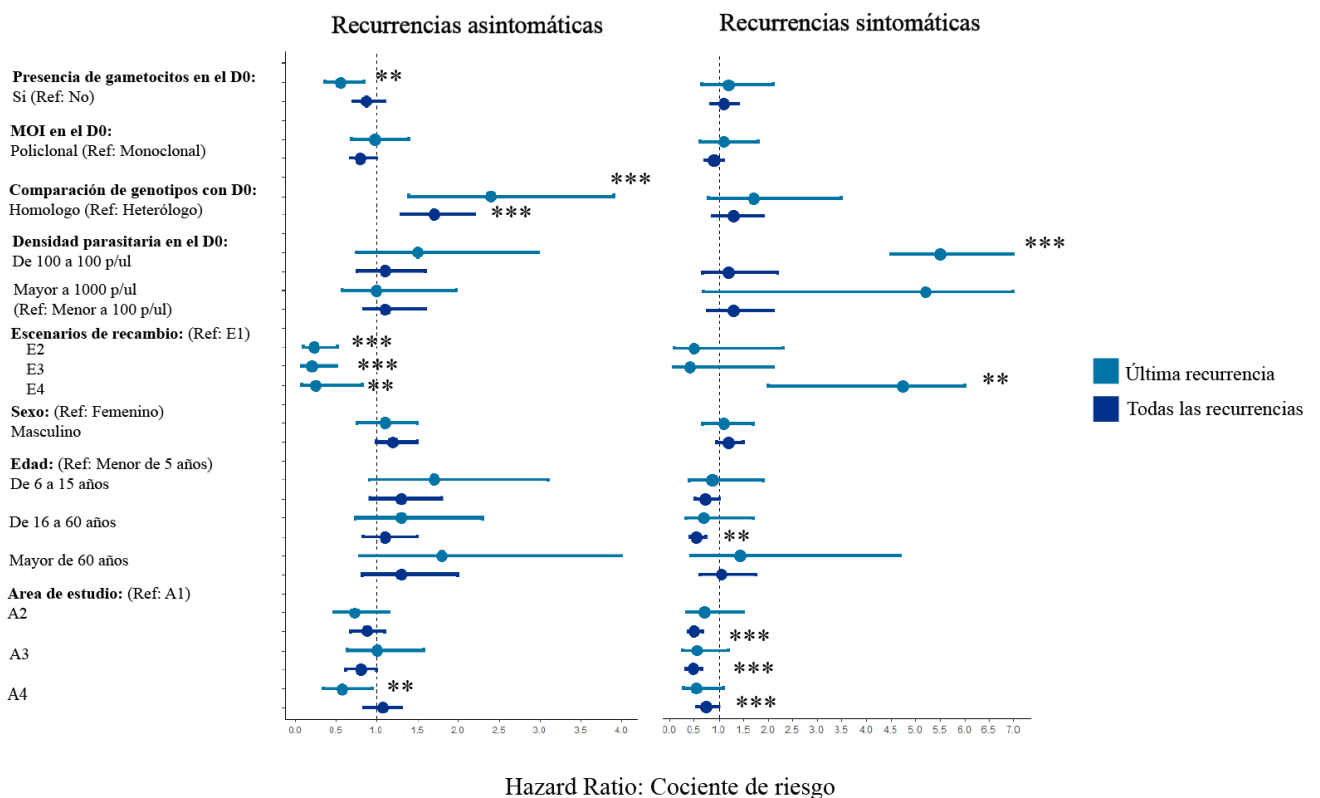


Figura N°15: Forest-plot de los cocientes de riesgo de las variables asociadas a las recurrencias asintomáticas y sintomáticas.

Factores asociados a las recurrencias asintomáticas y sintomáticas evaluadas entre todas las recurrencias y solo para la última recurrencia. 2. Diferencias significativas: *, p – valor < 0.05; **, p – valor < 0.01 y ***, p – valor < 0.001.

Teniendo en cuenta a todos los factores que obtuvieron un p -valor menor a 0.2 durante el análisis univariado (Tabla N°8 y Tabla N°9), se realizó el análisis multivariado de

COX-CP para todas las recurrencias (Tabla N°10) y COX-PH para la última recurrencia detectada de cada individuo (Tabla N°11).

Durante el análisis multivariado para todas las recurrencias asintomáticas, solo se encontró una asociación significativa con la **comparación de genotipos con el D0**; mientras que las recurrencias sintomáticas resultaron asociadas con **la edad y el área de estudio** (Tabla N°10) (Anexo N°5).

Tabla N°10: Análisis de riesgo multivariado de las recurrencias utilizando el modelo Cox CP entre asintomáticos y sintomáticos

Todas las Recurrencia		Recurrencias Asintomáticas			Recurrencias Sintomáticas		
		HR	Valor-P	95% IC	HR	Valor-P	95% IC
Comparación de genotipos con el D0	Heterólogo	Referencia			No significativo		
	Homólogo	1.7	<0.001	[1.29 - 2.2]			
Multiplicidad de infección (MOI)	Monoclonal	Referencia			No significativo		
	Policlonal	0.84	0.182	[0.65 - 1.1]			
Edad	Menos de 5 años	Referencia			Referencia		
	De 6 a 15 años	1.4	0.083	[0.96 - 2.1]			
	De 16 a 60 años	1.17	0.394	[0.81 - 1.7]			
	Mayor de 60 años	1.35	0.259	[0.8 - 2.3]			
Presencia de gametocitos en el D0	Negativo	Referencia			No significativo		
	Positivo	0.85	0.193	[0.66 - 1.1]			
Sexo	Femenino	Referencia			Referencia		
	Masculino	1.24	0.054	[1.0 - 1.6]			
Áreas de estudio	A1	Referencia			Referencia		
	A2	0.97	0.832	[0.7 - 1.3]			
	A3	0.9	0.505	[0.65 - 1.2]			
	A4	0.85	0.249	[0.64 - 1.1]			

Análisis multivariable de COX CP (counting process), para evaluar los factores asociados a las recurrencias sintomáticas y asintomáticas. Factor protector: HR<1, Factor de riesgo: HR>1.

Al evaluar **la comparación de genotipos con el D0**, la aparición de recurrencias homólogas incrementa el riesgo en 1.7 veces más en comparación a un episodio heterólogo para que estas recurrencias se desarrollen como asintomáticas en el tiempo (HR=1.7 [IC: 1.29 – 2.2], p<0.001) (Tabla N°10).

Respecto a **la edad**, en individuos de 10 a 60 años se disminuye el riesgo en el tiempo de sufrir una recurrencia sintomática en 0.63 veces en comparación a individuos infantes menores de 5 años (HR= 0.63 [IC: 0.46 – 0.86], p=0.004). Por otro lado, respecto al **área de estudio**, pertenecer a las áreas A2 (HR=0.54 [IC: 0.40 – 0.73], p <0.001), A3 (HR=0.48 [IC: 0.36 – 0.72], p<0.001) y A4 (HR=0.71 [IC: 0.49 – 0.88], p=0.023) disminuye el riesgo en el tiempo de presentar una recurrencia sintomática en comparación a ser del área A1. Por último, se observó que ser del sexo masculino tuvo una tendencia a presentar una asociación de riesgo tanto para que se dé una recurrencia sintomática como una asintomática (Tabla N°10).

Finalmente; para el análisis multivariado de las últimas recurrencias, solo se evaluó la asociación con recurrencias asintomáticas, ya que ninguna variable evaluada en el análisis univariado en recurrencias sintomáticas cumplieron con el requisito mínimo de valor-p ≤ 0.2 (Tabla N°11).

Tabla N°11: Análisis de riesgo multivariado para la última recurrencia utilizando el modelo Cox PH.

Última Recurrencia		Recurrencias Asintomáticas		
		HR	Valor-P	95% IC
Comparación de genotipos con el D0	Heterólogo	Referencia		
	Homólogo	3.13	<0.001	[1.80 - 5.42]
Edad	Menor a 5 años	Referencia		
	De 6 a 15 años	2.62	0.01	[1.26 - 5.46]
	De 16 a 60 años	2.1	0.034	[1.06 - 4.18]
	Mayor a 60 años	2.42	0.077	[0.91 - 6.46]
Área de estudio	A1	Referencia		
	A2	0.77	0.335	[0.44 - 1.19]
	A3	1.27	0.353	[0.77 - 1.09]
	A4	0.56	0.031	[0.33 - 0.95]
Presencia de gametocitos	Negativo	Referencia		
	Positivo	0.55	0.009	[0.35 - 0.86]

Análisis multivariable de COX PH (Proporcional Hazard), para evaluar factores asociados a las últimas recurrencias asintomáticas. Factor protector: HR<1, Factor de riesgo: HR>1. El número de * representa el grado de significancia de valor-P. Diferencias significativas: *, p – valor< 0.05; **, p – valor <0.01 y ***, p – valor < 0.001.

Por consiguiente, respecto a la **comparación de genotipos con el D0**, una infección recurrente homóloga aumenta el riesgo de que la última recurrencia sea asintomática

en 3.13 veces más que una recurrencia heteróloga en el tiempo ($p < 0.001$, HR= 3.13 [1.62 – 4.66]). Por otro lado, según **la edad**, ser mayor de 5 años aumenta el riesgo en el tiempo en presentar una última recurrencia asintomática. Esto se puede observar en el grupo de 6 a 15 años donde el riesgo es 2.62 veces mayor en comparación a los menores de 5 años (HR = 2.62 [IC: 1.26 – 5.46], $p=0.01$), al igual que en los individuos de 16 a 60 años (HR = 2.1 [IC: 1.06 – 4.18], $p=0.034$) y los mayores de 60 años (HR=2.42 [IC: 0.91 – 6.46], $p=2.42$). También se encontró asociación respecto **al área de estudio**, donde pertenecer al área A4 disminuye el riesgo casi a la mitad para presentar una última recurrencia asintomática en comparación al área A1 (HR= 0.56 [0.33 – 0.95], $p= 0.031$). Así mismo, la **presencia de gametocitos durante la infección inicial** de cada individuo disminuye en 0.55 el riesgo de que se desarrolle una última recurrencia asintomática al compararla con la ausencia de esta característica (HR=0.55 [0.35 - 0.86], $p=0.009$) (Tabla N°11).

VII. DISCUSIÓN

En los últimos años, el número de casos de malaria a nivel mundial han venido descendiendo para la mayoría de los países afectados, consecuencia de las múltiples estrategias de eliminación que se han venido aplicando hasta la actualidad (90). A pesar de esto, ya se tiene evidencia de la rápida recuperación que puede presentar el parásito frente a la falta de continuidad de las estrategias y a las adaptaciones del parásito a la presión de su eliminación (29,91). Durante este estudio se observó la situación del paludismo en 29 comunidades cercanas a la ciudad de Iquitos que venían siendo beneficiadas, en su mayoría, por las intervenciones del programa PAMAFRO, lo que permitió una disminución histórica de casos en toda la región (28). Por lo tanto, este escenario refleja un paralelismo a lo que está aconteciendo en la actualidad luego de la aplicación de la primera y segunda etapa del Plan Malaria Cero, que se vino ejecutando desde el año 2017 al 2021. Esta trajo como consecuencia en la población, la disminución de casos (26) y la aparición de adaptaciones convenientes para la supervivencia de la especie (91).

A diferencia de los estudios previos hechos con esta misma data donde se clasifica a las 29 comunidades en 5 áreas, para este estudio se recategorizaron en solo 4 áreas. Presentando a A1 y A4 como las áreas más aisladas y a A2 y A3 como las áreas con mas accesibles. Durante los análisis resaltaron ciertas características de las dos áreas consideradas las mas aisladas. En el caso de A1, área donde solo accede mediante vía fluvial,

Se identificaron gametocitos solo en el 8.5% de los episodios recurrentes, tratándose en su mayoría de infecciones sintomáticas. Debido a que el mayor número de infecciones con gametocitos se identificaron durante la primera infección. A diferencia de los tiempos con alta incidencia de malaria, en este escenario la presencia de gametocitos es menos frecuente. Esto se observa en un estudio longitudinal hecho por Rovira –Vallbona y col. realizada en las comunidades de Cahuide y Lupuna en un periodo de tiempo donde se presentó un pico en los casos de paludismo (2013-2014). Aquí se registró que más del 28% de las infecciones evaluadas presentaban gametocitos y casi el 60% de estas infecciones eran asintomáticas (56). En conclusión; a diferencia de los años 2008 a 2010 en los que se dio nuestro estudio, en el caso de

Cahuide y Lupuna, las infecciones asintomáticas presentaron un mayor aporte a la transmisión silenciosa del parásito debido a que estas contaban con la presencia de gametocitos; a pesar de que en este estudio no se consideró la evaluación de las recurrencias (56,92). Mientras que en nuestro estudio, a pesar del bajo número de recurrencias asintomáticas con presencia de gametocitos, estos se estuvieron desarrollando incluso bajo la disminución de casos y el efecto de la primaquina, siendo este el único fármaco eficaz contra gametocitos maduros y que forma parte del tratamiento Cura Radical (93,94).

Otro punto importante a discutir, es la facultad que presentan los gametocitos para desarrollarse a un nivel submicroscópico o muy cercano al umbral de la detección microscópica. Esto es un factor a considerar al evaluar los niveles encontrados en este estudio, ya que solo se realizó este diagnóstico a nivel microscópico, a diferencia del artículo de Rovira – Vallbona, en el que se realizó la cuantificación mediante métodos moleculares (94,95). Esto podría reflejar una posible sobrestimación de la asociación protectora encontrada a nivel de la última recurrencia; ya que en otros estudios donde también se evalúa a los factores asociados, la presencia de gametocitos se presenta como un factor de riesgo para presentar episodios recurrentes, distinto a lo encontrado en este trabajo (75,78). Finalmente, nuestros resultados podrían estar subestimando el real aporte de las recurrencias asintomáticas en la transmisión del parásito a nivel de la carga de gametocitos. Sobre todo, frente a los diversos estudios realizados en otras regiones del mundo, donde a través de un diagnóstico molecular, se otorga una alta relevancia a las infecciones asintomáticas en la transmisión a través de los gametocitos de *Plasmodium vivax* (96–99).

La edad es un factor que presenta una relación directa con el desarrollo inmunológico de los individuos en riesgo. El desarrollo de la patogenia de una infección por malaria u otra enfermedad infecciosa depende de esta capacidad de respuesta inmunológica. Por consiguiente, según la epidemiología del paludismo, los menores de edad incluidos lactantes y niños menores de 5 años pertenecen a una población altamente vulnerable y en riesgo de mortalidad (18,90). Esto se debe a que el sistema inmunológico de estos individuos aún está en etapa inmadura y en pleno desarrollo (100). Existen hallazgos que comprueban que la población infantil es más vulnerable debido a que presenta una producción disminuida de proteínas receptoras importantes para la defensa inmune, como el tipo interferón (IFN- α y IFN-g) e interleucinas (IL-12p70); además de una

capacidad reducida para producir diferentes tipos de citoquinas. Sumado a esto, los niños menores de 5 años presentan una respuesta disminuida de células antiparasitarias T-helper, lo que causa un aumento en la susceptibilidad de los niños a infecciones intracelulares como la producida por el paludismo (100). No obstante, la baja exposición a patógenos durante esta primera etapa de vida también favorece a la presencia de un sistema inmune aún susceptible (101). En entornos endémicos o de constante prevalencia del parásito, los individuos se enfrentan a una exposición constante desde una edad temprana, lo que puede ir favoreciendo al desarrollo prematuro de una respuesta inmune a la infección. Durante un estudio se observó como el desarrollo del sistema inmune está en constante evolución y adaptación, incluso en niños de tres meses de edad; que luego de una infección por malaria, se ha registrado una rápida diversificación de anticuerpos y una hipermutación somática constante, que va en aumento a través de los episodios recurrentes que sufren estos niños al crecer, incluso viéndose más acelerada dentro del primer año de vida (102). Esto también se observó en un estudio que evaluó a un grupo de niños que sufrieron constantes episodios de malaria a lo largo de 8 años de seguimiento, donde se encontró que sufrir múltiples episodios de malaria está relacionados con la modificación del sistema inmune. Los niños que sufrieron más de 8 episodios presentaron una regulación positiva de genes inducibles por interferón y un aumento en la producción de la citoquina inmunoreguladora Il-10, neutrófilos, células B y células T CD8; siendo estas adaptaciones un indicador del desarrollo de inmunidad a futuras infecciones y demostrando que la adaptación inmunológica se ve favorecida por los episodios recurrentes (103). Además, como ya se mencionó, el desarrollo de una inmunidad favorecida por los episodios recurrentes también incrementa la capacidad del individuo en desarrollar infecciones asintomáticas (47,49).

En nuestro estudio, el 43% de la población evaluada lo conforman niños menores de 15 años, siendo en general, una población mayoritariamente joven (Tabla N°2). Por esta razón, es importante considerar cómo se asocia la edad con la presencia de recurrencias asintomáticas. En este caso, según la caracterización de las infecciones recurrentes, solo en los individuos menores de 5 años, el número de recurrencias sintomáticas registradas tuvo un porcentaje apenas mayor de 51%; a diferencia del resto de categorías etarias (Tabla N°5). Por esta razón, el riesgo a presentar una recurrencia asintomática es menor en niños menores de 5 años, incluso al comparar el

riesgo con menores de 6 a 15 años de edad (Tabla N°10). En general, existe una asociación de riesgo a presentar episodios recurrentes asintomáticos, que se va incrementando según el crecimiento del individuo y el desarrollo de la adaptación inmunológica frente a la constante exposición del individuo al parásito (104–106). Esta adaptación se va dando de forma acelerada conforme pasan los años; dándose porcentajes altos de recurrencias asintomáticas incluso en menores de edad (107). Por ello, los niños menores de 5 años aun llegan a ser una población vulnerable y con la capacidad de favorecer a la transmisión del parásito (108).

El análisis de factores de riesgo aplicado en este trabajo busca encontrar cómo ciertas características relacionadas al hospedero, al parásito y a la infección tratan de explicar la dinámica de contagio del parásito a través de las recurrencias asintomáticas en un escenario de malaria residual. Además, se buscó **identificar factores predictores que puedan aportar en la identificación y prevención de este tipo de infecciones provocadas por *Plasmodium vivax*.**

Dentro de estos resultados, ser hombre es un factor con tendencia a riesgo tanto para presentar una recurrencia asintomática como sintomática. Por esta razón, ser del sexo masculino refleja una fuerte asociación de riesgo para el desarrollo de una recurrencia en el tiempo (Anexo N°7). Esta asociación se ha evaluado en otros estudios, que además han aportado con factores sociodemográficos; dando como principal razón al nivel alto de exposición que presentan los hombres en estas comunidades rurales en su vida diaria, ya sea por actividades económicas, sociales o por diferencias inmunológicas u hormonales (79,109–113). Como ya se mencionó, al evaluar la edad del individuo, la constante exposición al parásito puede estar favoreciendo al riesgo de presentar recurrencias asintomáticas conforme pasan los años, presentándose incluso en estas comunidades de manera acelerada, ya que se observó esta asociación de riesgo en niños desde los 6 años.

Respecto al área de estudio; cada área estaba conformada por un número distinto de personas enroladas. Al evaluarse las características básicas de los individuos por cada área de estudio, no se llegó a encontrar una diferencia significativa entre estas. Sin embargo, hubo cosas interesantes en contrastar sobre todo entre las áreas aisladas (A1 y A4) y las áreas con mayor acceso. Según los resultados mostrados en un estudio previo realizado por Delgado-Ratto y col. que evaluó a los mismos individuos, se

mostró que a nivel genético las áreas A2 y A3 presentaron un mayor flujo génico entre sus comunidades y la ciudad de Iquitos. Caracterizándose por presentar un mayor número de infección policlonales a diferencia de las comunidades más aisladas (71). Por otro lado, en el caso de las áreas aisladas, A1 representa a las comunidades que han registrado números altos tanto para recurrencias asintomáticas como sintomáticas a lo largo del tiempo. Por esta razón, en A1 se presenta un mayor riesgo a presentar recurrencias tanto sintomáticas como asintomáticas a través del tiempo en comparación a las otras áreas de estudio. El acceso a esta área es solo por vía fluvial, a través el río Nanay. Debido a esto sus comunidades son consideradas como aisladas y de difícil acceso, a pesar de tener una cercanía espacial a la ciudad de Iquitos. Sin embargo; el mismo estudio previo evaluó que existe un alto rango de movilidad de individuos que se transportan hacia y desde las comunidades de A1 tanto de la ciudad de Iquitos como con otras áreas y que posiblemente estén movilizando también al parásito (71). Además, las comunidades de A1 han sido ya intervenidas por el programa PAMAFRO (28). En consecuencia, la prevalencia de estos episodios recurrentes en el área A1 pueden ser consecuencia de la posible estructuración genética que se estuvo dando en las poblaciones parasitarias gracias a los planes de eliminación y al aislamiento, en conjunto al flujo génico de parásitos (a través del movimiento humano) que se registró en los años del estudio (71,72). Inclusive, se llegó a la conclusión que todas las áreas que habían pasado por la intervención del programa PAMAFRO como A1, A2 y A3 estaban pasando por un efecto cuello de botella que se reflejaba en la pérdida significativa de alelos raros en la población. Mientras que A4 al presentar áreas sin intervención previa, estaba presentando una extensión de parásitos clonales (71,72). Este escenario favorece al incremento de infecciones submicroscópicas y asintomáticas, ya que son el tipo de infección y/o recurrencia más frecuentes en estas comunidades (21,27). Sin embargo, se necesitaría realizar una evaluación más profunda sobre la filogenia o historia de vida de estas comunidades parasitarias y complementarlas con otros factores sociodemográficos que ayude a descifrar de una forma más certera lo descrito en estos resultados. Por último, los análisis realizados en este estudio se enfocaron a nivel de la población total, clasificando a las recurrencias entre asintomáticas y sintomáticas, y no según área geográfica. Esto es debido a que la categorización de estas misma puede no ser tan certera, sobre todo entre las áreas A2 y A3, ya que genéticamente presentaban

características similares, incluso a nivel de la migración y flujo génico. Por otro lado, el número de individuos y el número de comunidades evaluadas dentro de cada área no fue equitativa, pudiendo crear un sesgo y una disminución en el número de individuos evaluados para cada análisis. Finalmente, es el área A4 la que presento una diferencia interesante a nivel de su estructuración genética y poblacional en comparación a las otras áreas. Características que también terminan resaltado a través de los análisis de las recurrencias en este trabajo. Sin embargo, debido a lo ya mencionado, crearía un gran sesgo el evaluar solo a esta área por separado y compararla con el total de las otras áreas; siendo incluso algo ya evaluado en trabajos previos enfocados en el estudio genético de estas áreas y de solo A4 (71,72).

Una característica de la población parasitaria evaluada en este estudio es que según multiplicidad de infección (MOI), se presentó una mayor frecuencia de infecciones monoclonales, confirmando lo evaluado previamente en otras investigaciones (56,57,97,98). Esto nos muestra que la evaluación del MOI nos puede dar información sobre cómo se conforma la población parasitaria. Según nuestros resultados, los individuos con una primera infección policlonal presentan una tendencia a tener una asociación protectora para el desarrollo de recurrencias asintomáticas, ya que estas tienden a darse después en el tiempo en comparación a las recurrencias monoclonales (Anexo N°8). Existe evidencia que describe que una infección policlonal se puede estar dando por un contagio mediante gemelos meióticos (117) o por la reactivación de hipnozoitos arrestados previamente en el hígado (118), siendo ambas condiciones ideales para el incremento de la diversidad genética del parásito a nivel intra-hospedero y que posiblemente se esté desarrollando a través de los episodios recurrentes (119). Un estudio previo hecho con esta misma data, evaluó mediante un AMOVA que la fuente principal de la variación genética provino de la variación dentro de las comunidades en lugar de la variación entre las áreas. Esta variación se puede explicar por la coexistencia de diferentes haplotipos dentro de las comunidades, pudiendo ser el resultado del flujo génico, la deriva genética, al gran reservorio oculto de *Plasmodium vivax* a nivel intra-hospedero, o por la sobrestimación de haplotipos distintos que son provocados por la alta mutabilidad de los microsatélites (114). Finalmente, nuestro estudio identificó que tener recurrencias homólogas es un factor de riesgo a presentar recurrencias asintomáticas. Esto se da en consecuencia a que estas asociaciones están afectadas por la influencia del tiempo, para este caso en las curvas

de riesgo de Nelson Aalen, se describe que durante el tiempo de evaluación las recurrencias homólogas aparecían antes en el tiempo en comparación a las recurrencias heterólogas (Anexo N°8). Frente a un primer escenario donde se dan en su mayoría infecciones clónales y repetitivas, conforme pasa el tiempo, estas fomentan la aparición de recurrencias asintomáticas y promueven la activación de parásitos con distintas cargas genéticas para el desarrollo tardío de recurrencias heterólogas con la primera infección, siendo estos escenarios (E2 y E3) los más frecuentes durante esta evaluación (Figura N°12).

La evaluación de estos factores a través de su tipo de asociación, densidad de incidencia y su desarrollo en el tiempo, nos permite discutir cómo estos se pueden relacionar y estar presentes en un escenario real. El uso de factores asociados ya ha sido utilizado como herramienta epidemiológica para la prevención de recurrencias por *P. vivax* (75). Sin embargo, en este caso es importante el poder identificar los niveles de la enfermedad a los que puede estar asociados estos factores. Se realizó un análisis de asociación COX-CP para evaluar los factores asociados a recurrencias; en este caso también se encontró que las recurrencias homólogas y ser del sexo masculino están asociados a riesgo a presentar recurrencias (Anexo N°8). Estos factores coinciden con lo identificado solo para las recurrencias asintomáticas, pudiendo significar un sesgo para la identificación específica de asociación a este tipo de recurrencias. No obstante, la coincidencia en estos factores asociados se puede deber a que la cantidad de las recurrencias asintomáticas (n=398 recurrencias) evaluadas en este estudio fue mayor a las recurrencias sintomáticas (n=211 recurrencias) y que esta diferencia haya tenido una mayor influencia en el análisis (Anexo N°8). Estos resultados reflejan una realidad frecuente del paludismo en las localidades de nuestra región, donde las recurrencias asintomáticas presentan una mayor relevancia debido a su alta frecuencia y a toda la problemática relacionada a estas. Por esta razón se considera que es incluso más acertado enfocarse en el análisis directo de este tipo de infecciones. Como reflejo de ello, si hubo diferencias entre los factores asociados a recurrencias sintomáticas y asintomáticas (Tabla N°9).

VII.1 Limitaciones:

Una de las limitaciones más importantes de este trabajo fue la utilización de microsatélites para el análisis de genotipo de las infecciones y sus recurrencias. Debido a que algunas muestras no pudieron amplificar de forma adecuada (4.4%, 40/911 infecciones registradas), se perdió información relevante durante la comparación de genotipos, siendo un problema ya registrado en otros estudios (120,121). Por esta razón, el uso de técnicas más modernas como el secuenciamiento del genoma completo, podría ofrecernos información más amplia de la situación genética del parásito a nivel poblacional e intra-hospedero, así como su análisis a nivel filogenético. Sin embargo, estas tecnologías son más costosas e implican una excelente calidad y cantidad de ADN, que en una situación de baja parasitemia es muy complicado conseguir (65).

Otra limitación que es importante mencionar es la falta de una medición molecular de la parasitemia, tanto para la medición de trofozoítos y gametocitos, durante la intervención inicial y el seguimiento de las recurrencias; ya que se realizaron solo por microscopía. Esto puede estar subestimando el aporte de las infecciones asintomáticas a la transmisión del parásito, al no registrar gametocitos durante las intervenciones. Por otro lado, no se pudo contar con datos sociodemográficos para este estudio, debido a que los censos realizados por hogar tuvieron identificadores distintos a las intervenciones de la cohorte, no permitiendo la identificación esta información en los individuos a los que se les realizó los seguimientos. Este tipo de información hubiese brindado un aporte importante al análisis de factores asociados y nos permitiría conocer una perspectiva más amplia de la transmisión del parásito y el comportamiento del hospedero.

Finalmente, este estudio retrospectivo de los factores asociados a las recurrencias y sus características de evolución según presencia de síntomas tiene una relevancia importante en el escenario actual de malaria residual en el Perú. La metodología aplicada se puede replicar con data más actual, con tecnología más avanzada e incluyendo comunidades que presenten actualmente una mayor relevancia epidemiológica; ya que, a pesar de ser escenarios parecidos, estos tiempos de pandemia y globalización pueden presentar factores distintos que puedan aportar en la eliminación de la malaria en el Perú.

VIII. CONCLUSIONES

Este trabajo de investigación nos ha permitido realizar una relevante evaluación a las infecciones por *Plasmodium vivax* a través del estudio de los factores asociados a la aparición de recurrencias asintomáticas. A continuación, se describe las principales conclusiones extraídas de esta investigación:

1. La mayoría de la población evaluada presentó al menos un episodio recurrente (66%). Además, más de la mitad de estos individuos provenían de las áreas A1 y A4, consideradas como las áreas más aisladas. Por otro lado, se encontró una subestimación en la presencia de gametocitos dentro de las recurrencias asintomáticas, debido a limitaciones en el diagnóstico por microscopía.
2. Los niños menores de 5 años aún presentan un mayor riesgo a presentar síntomas o fiebre durante una infección por *P. vivax*, ya que un 53% del total sufrió al menos una recurrencia sintomática.
3. Existe un mayor riesgo a través del tiempo a sufrir una recurrencia sintomática. Donde el tiempo medio para que se dé esta infección es menor (292 días) a que se dé una recurrencia asintomática (392 días). Sin embargo, existe una incidencia alta a que estas recurrencias cambien a ser asintomáticas si previamente fueron sintomáticas a través del tiempo.
4. Respecto a la evaluación de la evolución de la diversidad intra-hospedera, existe una tendencia a que los episodios recurrentes permanezcan como heterólogos o cambian a serlo si previamente eran recurrencias homólogas.
5. Presentar recurrencias homólogas, ser del sexo masculino y tener más de 5 años fueron factores de riesgo para presentar recurrencias asintomáticas a lo largo del tiempo. Estos factores están relacionados tanto al individuo como al parásito.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Delgado-Ratto Richard Christopher DJ. Exploring the population genetics and transmission dynamics of *Plasmodium vivax* and its influence on the epidemiology of malaria in the Peruvian Amazon. Chapter 6:241.
2. Cowman AF, Healer J, Marapana D, Marsh K. Malaria: Biology and Disease. Cell. 20 de octubre de 2016;167(3):610-24.
3. Bourgard C, Albrecht L, Kayano ACAV, Sunnerhagen P, Costa FTM. *Plasmodium vivax* Biology: Insights Provided by Genomics, Transcriptomics and Proteomics. Front Cell Infect Microbiol. 8 de febrero de 2018;8:34.
4. Ejigiri I, Sinnis P. *Plasmodium* sporozoite-host interactions from the dermis to the hepatocyte. Curr Opin Microbiol. agosto de 2009;12(4):401-7.
5. Frevert U. Sneaking in through the back entrance: the biology of malaria liver stages. Trends Parasitol. 1 de septiembre de 2004;20(9):417-24.
6. Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Kochar DK, Alonso PL, et al. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. Lancet Infect Dis. 1 de septiembre de 2009;9(9):555-66.
7. Richter J, Franken G, Mehlhorn H, Labisch A, Häussinger D. What is the evidence for the existence of *Plasmodium ovale* hypnozoites? Parasitol Res. noviembre de 2010;107(6):1285-90.
8. Veletzky L, Groger M, Lagler H, Walochnik J, Auer H, Fuehrer HP, et al. Molecular evidence for relapse of an imported *Plasmodium ovale* wallikeri infection. Malar J. 9 de febrero de 2018;17:78.
9. Weatherall DJ, Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK, Casals-Pascual C, et al. Malaria and the red cell. Hematol Am Soc Hematol Educ Program. 2002;35-57.
10. Alano P. *Plasmodium falciparum* gametocytes: still many secrets of a hidden life. Mol Microbiol. octubre de 2007;66(2):291-302.
11. Sokhna C, Ndiath MO, Rogier C. The changes in mosquito vector behaviour and the emerging resistance to insecticides will challenge the decline of malaria. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. octubre de 2013;19(10):902-7.
12. White NJ. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. Malar J. 11 de octubre de 2011;10:297.
15. World Health Organization. Control and elimination of *plasmodium vivax* malaria: a technical brief [Internet]. World Health Organization; 2015. 64 p. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/181162>

14. Ngotho P, Soares AB, Hentzschel F, Achcar F, Bertuccini L, Marti M. Revisiting gametocyte biology in malaria parasites. *FEMS Microbiol Rev.* 1 de julio de 2019;43(4):401-14.
15. Adams JH, Mueller I. The Biology of *Plasmodium vivax*. *Cold Spring Harb Perspect Med.* septiembre de 2017;7(9):a025585.
16. Sato S. *Plasmodium*—a brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology. *J Physiol Anthropol.* 7 de enero de 2021;40(1):1.
17. Sochantha T, Van Bortel W, Savonnaroth S, Marcotty T, Speybroeck N, Coosemans M. Personal protection by long-lasting insecticidal hammocks against the bites of forest malaria vectors. *Trop Med Int Health TM IH.* marzo de 2010;15(3):336-41.
18. World Health Organization. Global technical strategy for malaria 2016–2030 [Internet]. 2021 update. Geneva: World Health Organization; 2021. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/342995>
19. Baird JK, Valecha N, Duparc S, White NJ, Price RN. Diagnosis and Treatment of *Plasmodium vivax* Malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 28 de diciembre de 2016;95(6 Suppl):35-51.
20. Resolución Ministerial N° 034-2022-MINSA [Internet]. [citado 3 de marzo de 2022]. Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/minsa/normas-legales/2723757-034-2022-minsa>
21. 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.* 28 de diciembre de 2016;95(6 Suppl):133-44.
22. Varo R, Balanza N, Mayor A, Bassat Q. Diagnosis of clinical malaria in endemic settings. *Expert Rev Anti Infect Ther.* enero de 2021;19(1):79-92.
23. Zheng Z, Cheng Z. Advances in Molecular Diagnosis of Malaria. *Adv Clin Chem.* 2017;80:155-92.
24. White NJ. Anti-malarial drug effects on parasite dynamics in vivax malaria. *Malar J.* 21 de marzo de 2021;20(1):161.
25. Popovici J, Tebben K, Witkowski B, Serre D. Primaquine for *Plasmodium vivax* radical cure: What we do not know and why it matters. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 24 de enero de 2021;15:36-42.
26. Resolución Ministerial N° 244-2017-MINSA [Internet]. Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/minsa/normas-legales/189846-244-2017-minsa>
27. Fernandez-Miñope C, Delgado-Ratto C, Contreras-Mancilla J, Ferrucci HR, Llanos-Cuentas A, Gamboa D, et al. Towards one standard treatment for uncomplicated *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria: Perspectives from and for the Peruvian Amazon. *Int J Infect Dis.* abril de 2021;105:293-7.

28. OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud. Compartiendo lecciones aprendidas. Proyecto control de la Malaria en las zonas fronterizas de la Región Andina: Un enfoque comunitario - PAMAFRO (2011, Día 1). [Internet]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/compartiendo-lecciones-aprendidas-proyecto-control-malaria-zonas-fronterizas-region>
29. Centro Nacional de Epidemiología Prevención y Control de Enfermedades - MINSA. Casos de Malaria - Perú años 1994 – 2016 y 2017 [Internet]. Disponible en: <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/sala/2017/SE19/malaria.pdf>
30. Rosas-Aguirre Á, Gamboa D, Rodriguez H, Llanos-Zavalaga F, Aguirre K, Llanos-Cuentas A. Uso de paneles de láminas estandarizadas para la evaluación de competencias en el diagnóstico microscópico de malaria en la amazonía peruana. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. octubre de 2010;27(4):540-7.
31. World Malaria Report 2010. [Internet]. Disponible en: https://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2010/worldmaliareport2010.pdf
32. Bendezu J, Rosas A, Grande T, Rodriguez H, Llanos-Cuentas A, Escobedo J, et al. Field evaluation of a rapid diagnostic test (Parascreen™) for malaria diagnosis in the Peruvian Amazon. *Malar J*. 7 de junio de 2010;9(1):154.
33. 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*. junio de 2010;82(6):1017-23.
34. Gamboa D, Ho MF, Bendezu J, Torres K, Chiodini PL, Barnwell JW, et al. A Large Proportion of *P. falciparum* Isolates in the Amazon Region of Peru Lack *pfhrp2* and *pfhrp3*: Implications for Malaria Rapid Diagnostic Tests. *PLOS ONE*. 25 de enero de 2010;5(1):e8091.
35. Grietens KP, Ribera JM, Soto V, Tenorio A, Hoibak S, Aguirre AR, et al. Traditional Nets Interfere with the Uptake of Long-Lasting Insecticidal Nets in the Peruvian Amazon: The Relevance of Net Preference for Achieving High Coverage and Use. *PLOS ONE*. 2 de enero de 2013;8(1):e50294.
36. Lainhart W, Bickersmith SA, Nadler KJ, Moreno M, Saavedra MP, Chu VM, et al. Evidence for temporal population replacement and the signature of ecological adaptation in a major Neotropical malaria vector in Amazonian Peru. *Malar J*. 29 de septiembre de 2015;14(1):375.
37. Casos de Malaria 2020, SE52. [Internet]. Disponible en: <https://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/sala/2020/SE52/malaria.pdf>
38. Minsa: En 75.4 % han disminuido los casos de malaria en Loreto entre 2017 y 2020 [Internet]. [citado 13 de junio de 2022]. Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/minsa/noticias/483463-minsa-en-75-4-han-disminuido-los-casos-de-malaria-en-loreto-entre-2017-y-2020>

39. Mueller I, Galinski MR, Tsuboi T, Arevalo-Herrera M, Collins WE, King CL. Natural acquisition of immunity to *Plasmodium vivax*: epidemiological observations and potential targets. *Adv Parasitol.* 1 de enero de 2013;81:77-131.
40. Boldt ABW, van Tong H, Grobusch MP, Kalmbach Y, Dzeing Ella A, Kombila M, et al. The blood transcriptome of childhood malaria. *EBioMedicine.* 10 de enero de 2019;40:614-25.
41. Sumner KM, Mangeni JN, Obala AA, Freedman E, Abel L, Meshnick SR, et al. Impact of asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection on the risk of subsequent symptomatic malaria in a longitudinal cohort in Kenya. Ferreira MU, Soldati-Favre D, Ferreira MU, Koepfli C, editores. *eLife.* 23 de julio de 2021;10:e68812.
42. Lin E, Kiniboro B, Gray L, Dobbie S, Robinson L, Laumaea A, et al. Differential Patterns of Infection and Disease with *P. falciparum* and *P. vivax* in Young Papua New Guinean Children. *PLOS ONE.* 4 de febrero de 2010;5(2):e9047.
43. Phimpraphi W, Paul RE, Yimsamran S, Puangsa-art S, Thanyavanich N, Maneeboonyang W, et al. Longitudinal study of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in a Karen population in Thailand. *Malar J.* 2 de junio de 2008;7(1):99.
44. Imwong M, Boel ME, Pagornrat W, Pimanpanarak M, McGready R, Day NPJ, et al. The First *Plasmodium vivax* Relapses of Life Are Usually Genetically Homologous. *J Infect Dis.* 15 de febrero de 2012;205(4):680-3.
45. Gowda DC, Wu X. Parasite Recognition and Signaling Mechanisms in Innate Immune Responses to Malaria. *Front Immunol.* 19 de diciembre de 2018;9:3006.
46. Schofield L, Grau GE. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol.* septiembre de 2005;5(9):722-35.
47. Chen J, Wang FK, He ZX, Bai Y. Progress in the Study of Epidemiologic Characteristics and Influencing Factors of Asymptomatic Malaria Infection in Africa. *Altern Ther Health Med.* 23 de febrero de 2021;AT6772.
48. Kumar R, Ng S, Engwerda C. The Role of IL-10 in Malaria: A Double Edged Sword. *Front Immunol.* 2019;10:229.
49. Frimpong A, Kusi KA, Tornyigah B, Ofori MF, Ndifon W. Characterization of T cell activation and regulation in children with asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection. *Malar J.* 13 de julio de 2018;17(1):263.
50. Milner DA. Malaria Pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* enero de 2018;8(1):a025569.
51. Pizzitutti F, Mena CF, Feingold B, Pan WK. Modeling asymptomatic infections and work-related human circulation as drivers of unstable malaria transmission in low-prevalence areas: A study in the Northern Peruvian Amazon. *Acta Trop.* septiembre de 2019;197:104909.

52. Moreno-Gutierrez D, Llanos-Cuentas A, Luis Barboza J, Contreras-Mancilla J, Gamboa D, Rodriguez H, et al. Effectiveness of a Malaria Surveillance Strategy Based on Active Case Detection during High Transmission Season in the Peruvian Amazon. *Int J Environ Res Public Health*. diciembre de 2018;15(12):2670.
53. 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*. 16 de octubre de 2017;16(1):415.
54. Branch O, Casapia WM, Gamboa DV, Hernandez JN, Alava FF, Roncal N, et al. Clustered local transmission and asymptomatic Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax malaria infections in a recently emerged, hypoendemic Peruvian Amazon community. *Malar J*. 23 de junio de 2005;4(1):27.
55. 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*. 4 de agosto de 2017;16:312.
56. 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*. 3 de julio de 2017;11(7):e0005674.
57. 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*. 6 de enero de 2014;13(1):8.
58. Lin JT, Saunders DL, Meshnick SR. The role of submicroscopic malaria in malaria transmission: what is the evidence? *Trends Parasitol*. abril de 2014;30(4):183.
59. White NJ, Imwong M. Chapter Two - Relapse. En: Hay SI, Price R, Baird JK, editores. *Advances in Parasitology* [Internet]. Academic Press; 2012 [citado 5 de noviembre de 2021]. p. 113-50. (*Advances in Parasitology*; vol. 80). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123979001000025>
60. 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*. julio de 2014;91(1):18-26.
61. 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*. 17 de enero de 2019;380(3):229-41.
62. McCollum AM, Soberon V, Salas CJ, Santolalla ML, Udhayakumar V, Escalante AA, et al. Genetic variation and recurrent parasitaemia in Peruvian Plasmodium vivax populations. *Malar J*. 24 de febrero de 2014;13:67.

63. Eede PV den, 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. PLOS ONE. 28 de enero de 2011;6(1):e16257.
64. Lin JT, Hathaway NJ, Saunders DL, Lon C, Balasubramanian S, Kharabora O, et al. Using Amplicon Deep Sequencing to Detect Genetic Signatures of Plasmodium vivax Relapse. J Infect Dis. 15 de septiembre de 2015;212(6):999-1008.
65. Cowell AN, Valdivia HO, Bishop DK, Winzeler EA. Exploration of Plasmodium vivax transmission dynamics and recurrent infections in the Peruvian Amazon using whole genome sequencing. Genome Med. 4 de julio de 2018;10(1):52.
43. Barbosa L, Da Silva E, De Almeida A, Salazar Y, Siqueira A, Alecrim M, et al. An Ultra-Sensitive Technique: Using Pv-mtCOX1 qPCR to Detect Early Recurrences of Plasmodium vivax in Patients in the Brazilian Amazon. Pathog Basel Switz [Internet]. 1 de diciembre de 2020 [citado 5 de noviembre de 2021];10(1).
67. Corder RM, Lima ACP de, Khoury DS, Docken SS, Davenport MP, Ferreira MU. Quantifying and preventing Plasmodium vivax recurrences in primaquine-untreated pregnant women: An observational and modeling study in Brazil. PLoS Negl Trop Dis. 31 de julio de 2020;14(7):e0008526.
68. Taylor AR, Watson JA, Chu CS, Puaprasert K, Duanguppama J, Day NPJ, et al. Resolving the cause of recurrent Plasmodium vivax malaria probabilistically. Nat Commun. 6 de diciembre de 2019;10:5595.
69. 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. 21 de agosto de 2020;223(8):1466-77.
70. Muela Ribera J, Hausmann-Muela S, Gryseels C, Peeters Grietens K. Re-imagining adherence to treatment from the “other side”: local interpretations of adverse anti-malarial drug reactions in the Peruvian Amazon. Malar J. 2 de marzo de 2016;15:136.
71. Delgado-Ratto C, Gamboa D, Soto-Calle VE, Eede PV den, Torres E, Sánchez-Martínez L, et al. Population Genetics of Plasmodium vivax in the Peruvian Amazon. PLoS Negl Trop Dis. 14 de enero de 2016;10(1):e0004376.
72. 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. 6 de enero de 2014;13(1):8.

73. Popovici J, Friedrich LR, Kim S, Bin S, Run V, Lek D, et al. Genomic Analyses Reveal the Common Occurrence and Complexity of Plasmodium vivax Relapses in Cambodia. *mBio*. 23 de enero de 2018;9(1):e01888-17.
74. Pham TV, Nguyen HV, Aguirre AR, Nguyen VV, Cleves MA, Nguyen XX, et al. Plasmodium vivax morbidity after radical cure: A cohort study in Central Vietnam. *PLOS Med*. 17 de mayo de 2019;16(5):e1002784.
75. Mat Ariffin N, Islahudin F, Kumolosasi E, Makmor-Bakry M. A clinical tool to predict Plasmodium vivax recurrence in Malaysia. *BMC Infect Dis*. 8 de diciembre de 2017;17:759.
76. 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*. 22 de enero de 2019;18(1):18.
77. Douglas NM, Kenangalem E, Hasanuddin A, Anstey NM, Sugiarto P, Price RN, et al. Malaria-related hospitalization during childhood in Papua, Indonesia: A retrospective cohort study. *PLOS ONE*. 29 de enero de 2020;15(1):e0228018.
78. Douglas NM, Nosten F, Ashley EA, Phaiphun L, van Vugt M, Singhasivanon P, et al. Plasmodium vivax Recurrence Following Falciparum and Mixed Species Malaria: Risk Factors and Effect of Antimalarial Kinetics. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1 de marzo de 2011;52(5):612-20.
79. Simões LR, Alves ER, Ribatski-Silva D, Gomes LT, Nery AF, Fontes CJF. Factors associated with recurrent Plasmodium vivax malaria in Porto Velho, Rondônia State, Brazil, 2009. *Cad Saude Publica*. julio de 2014;30(7):1403-17.
80. Silvino ACR, Kano FS, Costa MA, Fontes CJF, Soares IS, de Brito CFA, et al. Novel Insights into Plasmodium vivax Therapeutic Failure: CYP2D6 Activity and Time of Exposure to Malaria Modulate the Risk of Recurrence. *Antimicrob Agents Chemother*. 21 de abril de 2020;64(5):e02056-19.
81. Wampfler R, Hofmann NE, Karl S, Betuela I, Kinboro B, Lorry L, et al. Effects of liver-stage clearance by Primaquine on gametocyte carriage of Plasmodium vivax and P. falciparum. *PLoS Negl Trop Dis*. 21 de julio de 2017;11(7):e0005753.
82. 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*. 8 de abril de 2019;18:124.
83. Maneerattanasak S, Gosi P, Krudsood S, Chikka P, Tongshoob J, Mahakunkijcharoen Y, et al. Molecular and immunological analyses of confirmed Plasmodium vivax relapse episodes. *Malar J*. 30 de mayo de 2017;16:228.
84. Mendonça VR, Souza LC, Garcia GC, Magalhães BM, Lacerda MV, Andrade BB, et al. DDX39B (BAT1), TNF and IL6 gene polymorphisms and association with

- clinical outcomes of patients with *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J.* 19 de julio de 2014;13:278.
85. Paludismo [Internet]. [citado 9 de diciembre de 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/malaria>
 86. Galatas B, Bassat Q, Mayor A. Malaria Parasites in the Asymptomatic: Looking for the Hay in the Haystack. *Trends Parasitol.* abril de 2016;32(4):296-308.
 87. 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. *Pathog Basel Switz.* 2 de marzo de 2021;10(3):282.
 88. Rubio JM, Post RJ, van Leeuwen WMD, Henry MC, Lindergard G, Hommel M. Alternative polymerase chain reaction method to identify *Plasmodium* species in human blood samples: the semi-nested multiplex malaria PCR (SnM-PCR). *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1 de abril de 2002;96(Supplement_1):S199-204.
 89. Karunaweera ND, Ferreira MU, Hartl DL, Wirth DF. Fourteen polymorphic microsatellite DNA markers for the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Mol Ecol Notes.* 2007;7(1):172-5.
 90. World Health Organization. World malaria report 2021 [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2021 [citado 3 de enero de 2022]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/350147>
 91. Prusty D, Gupta N, Upadhyay A, Dar A, Naik B, Kumar N, et al. Asymptomatic malaria infection prevailing risks for human health and malaria elimination. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis.* septiembre de 2021;93:104987.
 92. Meibalan E, Marti M. Biology of Malaria Transmission. *Cold Spring Harb Perspect Med.* marzo de 2017;7(3):a025452.
 93. White NJ. The role of anti-malarial drugs in eliminating malaria. *Malar J.* 11 de diciembre de 2008;7 Suppl 1:S8.
 94. Bousema T, Drakeley C. Epidemiology and Infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* Gametocytes in Relation to Malaria Control and Elimination. *Clin Microbiol Rev.* abril de 2011;24(2):377-410.
 95. Galinski MR, Meyer EVS, Barnwell JW. *Plasmodium vivax*: modern strategies to study a persistent parasite's life cycle. *Adv Parasitol.* 2013;81:1-26.
 96. Martins-Campos KM, Kuehn A, Almeida A, Duarte APM, Sampaio VS, Rodriguez ÍC, et al. Infection of *Anopheles aquasalis* from symptomatic and asymptomatic *Plasmodium vivax* infections in Manaus, western Brazilian Amazon. *Parasit Vectors.* 4 de mayo de 2018;11(1):288.
 97. Nguitragool W, Mueller I, Kumpitak C, Saeseu T, Bantuchai S, Yorsaeng R, et al. Very high carriage of gametocytes in asymptomatic low-density *Plasmodium*

- falciparum and *P. vivax* infections in western Thailand. *Parasit Vectors*. 24 de octubre de 2017;10(1):512.
98. Almeida ACG, Kuehn A, Castro AJM, Vitor-Silva S, Figueiredo EFG, Brasil LW, et al. High proportions of asymptomatic and submicroscopic *Plasmodium vivax* infections in a peri-urban area of low transmission in the Brazilian Amazon. *Parasit Vectors*. 20 de marzo de 2018;11(1):194.
 99. Koepfli C, Nguitragool W, de Almeida ACG, Kuehn A, Waltmann A, Kattenberg E, et al. Identification of the asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocyte reservoir under different transmission intensities. *PLoS Negl Trop Dis*. agosto de 2021;15(8):e0009672.
 100. PrabhuDas M, Adkins B, Gans H, King C, Levy O, Ramilo O, et al. Challenges in infant immunity: implications for responses to infection and vaccines. *Nat Immunol*. marzo de 2011;12(3):189-94.
 101. Marsh K, Kinyanjui S. Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunol*. febrero de 2006;28(1-2):51-60.
 102. Wendel BS, He C, Qu M, Wu D, Hernandez SM, Ma KY, et al. Accurate immune repertoire sequencing reveals malaria infection driven antibody lineage diversification in young children. *Nat Commun*. 14 de septiembre de 2017;8:531.
 103. Bediako Y, Adams R, Reid AJ, Valletta JJ, Ndungu FM, Sodenkamp J, et al. Repeated clinical malaria episodes are associated with modification of the immune system in children. *BMC Med*. 13 de marzo de 2019;17:60.
 104. Rosas-Aguirre A, Speybroeck N, Llanos-Cuentas A, Rosanas-Urgell A, Carrasco-Escobar G, Rodriguez H, et al. Hotspots of Malaria Transmission in the Peruvian Amazon: Rapid Assessment through a Parasitological and Serological Survey. *PLoS ONE*. 10 de septiembre de 2015;10(9):e0137458.
 105. Mensah BA, Myers-Hansen JL, Obeng Amoako E, Opoku M, Abuaku BK, Ghansah A. Prevalence and risk factors associated with asymptomatic malaria among school children: repeated cross-sectional surveys of school children in two ecological zones in Ghana. *BMC Public Health*. 17 de septiembre de 2021;21:1697.
 106. Gbalégba CGN, Ba H, Silué KD, Ba O, Tia E, Chouaibou M, et al. Distribution of *Plasmodium* spp. infection in asymptomatic carriers in perennial and low seasonal malaria transmission settings in West Africa. *Infect Dis Poverty* [Internet]. 2018 [citado 9 de mayo de 2022];7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5926534/>
 107. Callaway PC, Farrington LA, Feeney ME. Malaria and Early Life Immunity: Competence in Context. *Front Immunol*. 19 de febrero de 2021;12:634749.
 108. Nash SD, Prevots DR, Kabyemela E, Khasa YP, Lee KL, Fried M, et al. A Malaria-Resistant Phenotype with Immunological Correlates in a Tanzanian Birth

Cohort Exposed to Intense Malaria Transmission. *Am J Trop Med Hyg.* 3 de mayo de 2017;96(5):1190-6.

109. 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.* 4 de agosto de 2017;16(1):312.
110. Tarekegn M, Tekie H, Dugassa S, Wolde-Hawariat Y. Malaria prevalence and associated risk factors in Dembiya district, North-western Ethiopia. *Malar J.* 17 de septiembre de 2021;20(1):372.
111. Maude RJ, Ngo TD, Tran DT, Nguyen BTH, Dang DV, Tran LK, et al. Risk factors for malaria in high incidence areas of Viet Nam: a case-control study. *Malar J.* 17 de septiembre de 2021;20(1):373.
112. Klein SL. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. *Parasite Immunol.* julio de 2004;26(6-7):247-64.
113. Pathak S, Rege M, Gogtay NJ, Aigal U, Sharma SK, Valecha N, et al. Age-Dependent Sex Bias in Clinical Malarial Disease in Hypoendemic Regions. *PLoS ONE.* 25 de abril de 2012;7(4):e35592.
114. Delgado-Ratto C, Gamboa D, Soto-Calle VE, Eede PV den, Torres E, Sánchez-Martínez L, et al. Population Genetics of *Plasmodium vivax* in the Peruvian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis.* 14 de enero de 2016;10(1):e0004376.
115. Van den Eede P, Van der Auwera G, Delgado C, Huyse T, Soto-Calle VE, Gamboa D, et al. Multilocus genotyping reveals high heterogeneity and strong local population structure of the *Plasmodium vivax* population in the Peruvian Amazon. *Malar J.* 3 de junio de 2010;9:151.
116. Sutton PL, Neyra V, Hernandez JN, Branch OH. *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* Infections in the Peruvian Amazon: Propagation of Complex, Multiple Allele-Type Infections without Super-Infection. *Am J Trop Med Hyg.* diciembre de 2009;81(6):950-60.
117. Bright AT, Manary MJ, Tewhey R, Arango EM, Wang T, Schork NJ, et al. A High Resolution Case Study of a Patient with Recurrent *Plasmodium vivax* Infections Shows That Relapses Were Caused by Meiotic Siblings. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. junio de 2014 [citado 9 de mayo de 2022];8(6). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4046966/>
118. Nkhoma SC, Banda RL, Khoswe S, Dzoole-Mwale TJ, Ward SA. Intra-host dynamics of co-infecting parasite genotypes in asymptomatic malaria patients. *Infect Genet Evol.* noviembre de 2018;65:414-24.
119. Lopez L, Koepfli C. Systematic review of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* polyclonal infections: Impact of prevalence, study population characteristics, and laboratory procedures. *PLoS ONE.* 11 de junio de 2021;16(6):e0249382.

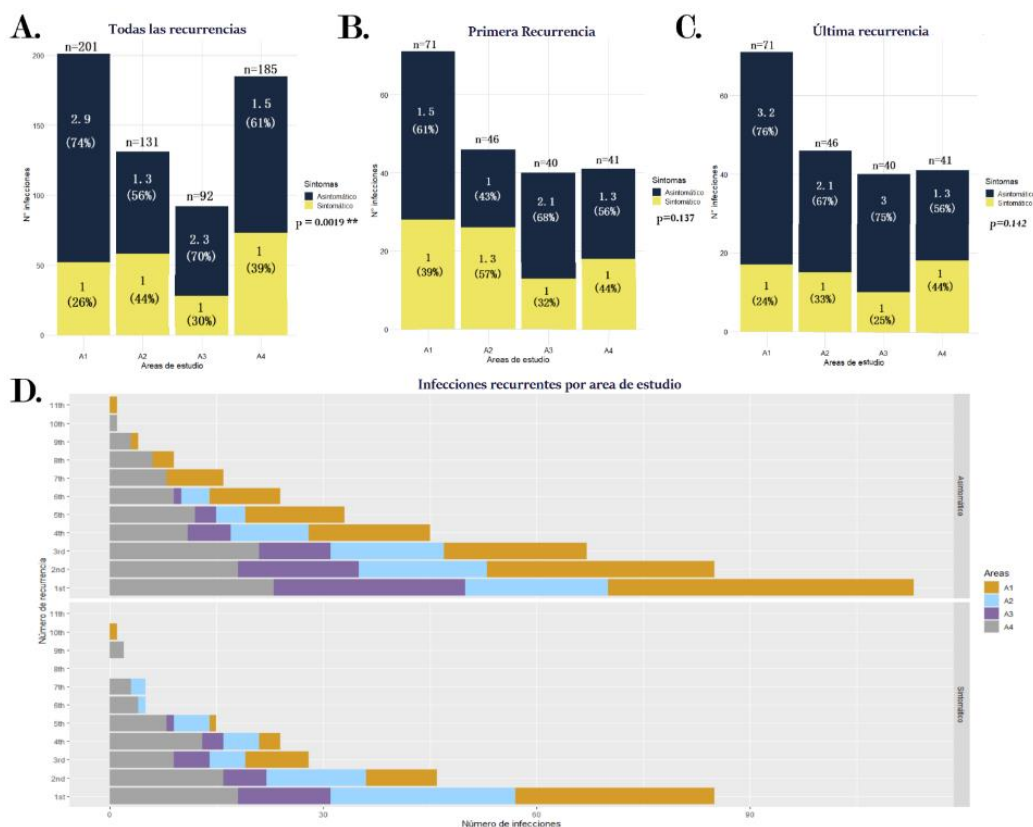
120. Negreiros S, Farias S, Viana GMR, Okoth SA, Chenet SM, de Souza TMH, et al. Efficacy of Chloroquine and Primaquine for the Treatment of Uncomplicated *Plasmodium vivax* Malaria in Cruzeiro do Sul, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2 de noviembre de 2016;95(5):1061-8.
121. McCollum AM, Soberon V, Salas CJ, Santolalla ML, Udhayakumar V, Escalante AA, et al. Genetic variation and recurrent parasitaemia in Peruvian *Plasmodium vivax* populations. *Malar J.* 24 de febrero de 2014;13:67.

X. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Anexo N°1: Tabla de comunidades por áreas de estudio.

Área de estudio	Comunidad	Distrito	N° de individuos evaluados
A1	Bambú	San Juan	1
	Fray Martin	Iquitos	10
	Lupuna	Iquitos	15
	Manacamiri	Iquitos	47
	San Pedro	Iquitos	10
	Santa Rita	Iquitos	29
A2	Aguaje	Iquitos	1
	Pampachica	Iquitos	1
	Porvenir	Iquitos	5
	San Juan	San Juan	63
A3	13 de febrero	San Juan	5
	5 de abril	San Juan	3
	Cahuide	San Juan	1
	Cruz del Sur	San Juan	1
	Delfines	San Juan	4
	El Dorado	San Juan	3
	El Triunfo	San Juan	4
	Ex-Petroleros	San Juan	5
	La Habana	San Juan	1
	Nuevo Horizonte	San Juan	4
	Paujil I y II	San Juan	4
	Peña Negra	San Juan	1
	San Lucas	San Juan	4
	Unión Progreso	San Juan	2
	Varillal	San Juan	21
A4	3 de octubre	San Juan	3
	El Milagro	San Juan	1
	San Carlos	San Juan	38
	Villa Buen	San Juan	15
	Pastor		

La data usada para este proyecto fue colectada de 29 comunidades y estas fueron divididas en 4 áreas de estudio. En total participaron 302 individuos. Comunidades resaltadas representa a las primeras evaluadas en el proyecto madre.



Anexo N°2: Presencias de recurrencias asintomáticas y sintomáticas por área de estudio.

Las figuras A, B, C presentan las proporciones entre las recurrencias asintomáticas y sintomáticas evaluadas por área de estudio. La evaluación de diferencia entre grupos se realizó mediante el Test de Fisher. Diferencia significativa solo al evaluar a todas las recurrencias por área de estudio. La figura D presenta el número de recurrencia sintomáticas y asintomáticas que se presentó por individuo entre las áreas de estudio.

Anexo N°3: Numero y porcentaje de riesgo para que se den los eventos recurrentes según presencia de sintomatología a través del tiempo.

Presencia de Síntomas										
Todas las infecciones										
Tiempo (días)	0	30	60	90	180	270	330	360	720	Mediana (días)
Asintomáticos										393 [IC: 358 - 426]
N°	491	486	474	464	386	324	269	247	39	
Porcentaje	0%	2%	3%	5%	19%	32%	42%	45%	88%	
Sintomáticos										292 [IC: 273 - 326]
N°	418	406	370	334	235	186	141	125	13	
Porcentaje	0%	3%	9%	14%	34%	46%	56%	62%	94%	
Última recurrencia										
Tiempo (días)	0	30	60	90	180	270	330	360	720	Mediana (días)
Asintomáticos										548 [IC: 514 - 610]
N°	138	138	138	137	132	119	107	101	31	

Porcentaje	0%	0%	0%	1%	5%	14%	23%	28%	78%	
Sintomáticos										502 [IC: 441 - 631]
N°	60	60	60	59	52	47	46	44	10	
Porcentaje	0%	0%	0%	3%	14%	23%	25%	27%	85%	

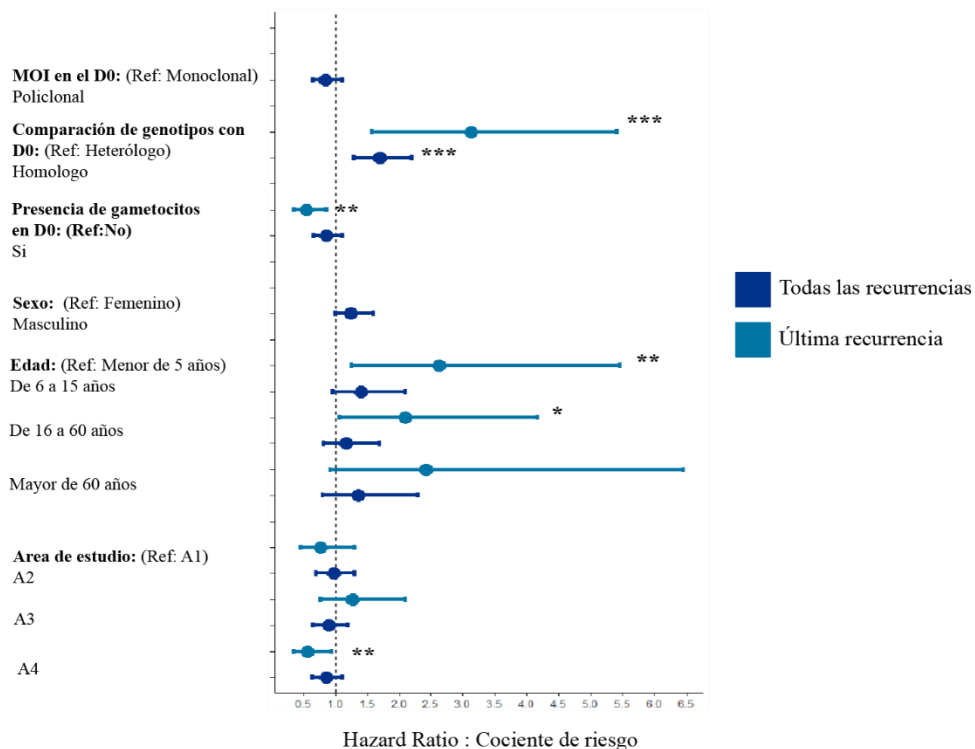
Análisis de curvas de riesgo Nelson-Aalen. N°: Número de casos según se estén dando los episodios recurrentes en el tiempo. %: porcentaje de riesgo a que se dé el episodio recurrente en determinado periodo de tiempo. La evaluación se realizó a nivel de todos los episodios recurrentes y solo a nivel de la última recurrencia entre episodios asintomáticos y sintomáticos.

Anexo N°4: Análisis de factor de riesgo multivariado para la primera recurrencia utilizando el modelo Cox PH entre asintomáticas y sintomáticas.

Primera Recurrencia		Recurrencias Asintomáticas			Recurrencias Sintomáticas		
		HR	Valor-P	95% IC	HR	Valor-P	95% IC
Estatus de detección	Microscópico	Referencia			No significativo		
	Submicroscópico	1.77	0.193	[0.75 - 4.16]			
Densidad Parasitaria	<=1000 p/μl	Referencia			Referencia		
	1001 - 5000 p/μl	0.17	0.036	[0.034 - 0.90]			
	>= 5000 p/μl	0.18	0.043	[0.039 - 0.997]			
Multiplicidad de infección (MOI)	Monoclonal	Referencia			No significativo		
	Policlonal	0.7	0.13	[0.42 - 1.12]			
Comparación de genotipos con D0	Homologo	Referencia			No significativo		
	Heterólogo	0.53	0.023	[0.31 - 0.92]			
Área de estudio	A1	Referencia			Referencia		
	A2	3.47	<0.001	[1.87 - 6.42]			
	A3	1.04	0.9	[0.61 - 1.77]			
	A4	1.46	0.2	[0.82 - 2.60]			
Año	2008	Referencia			No significativo		
	2009	0.11	<0.001	[0.06 - 1.19]			
	2010	0.005	<0.001	[0.0006 - 0.04]			

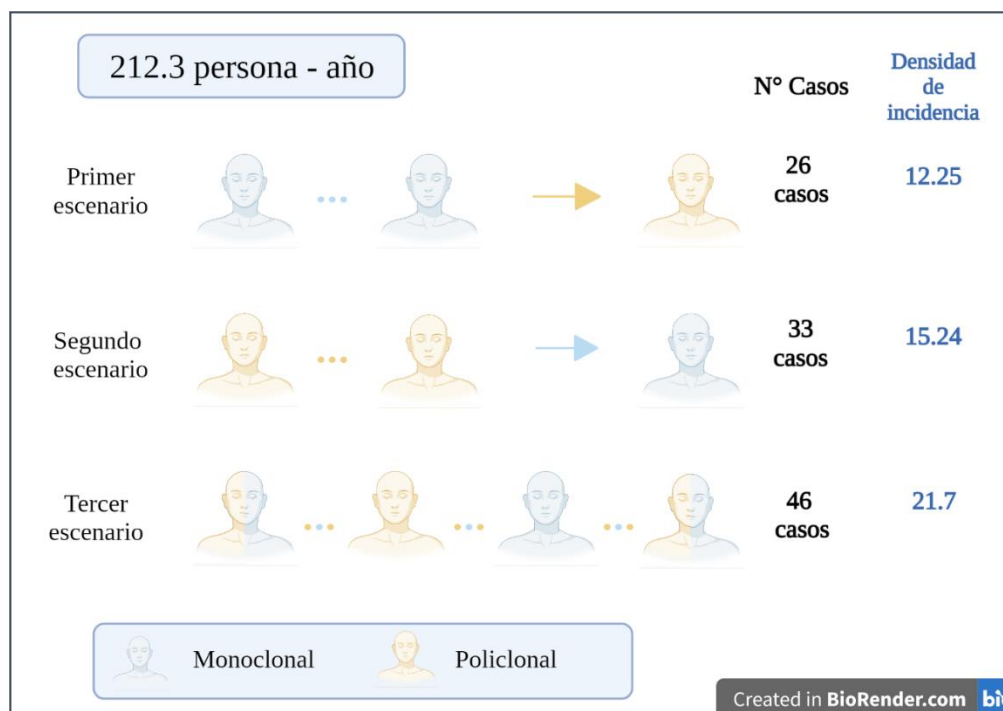
1. Análisis multivariable de COX PH (Proporcional Hazard), para evaluar factores asociados a las primeras recurrencias asintomáticas y sintomáticas. Factor protector: HR<1, Factor de riesgo: HR>1.

Analisis de multivariado: Recurrencias asintomáticas



Anexo N°5: Forest-plot multivariado de las recurrencias asintomáticas.

Analisis Univariado y Multivariado de factores asociados a las recurrencias asintomáticas y sintomáticas evaluadas entre todas las recurrencias y solo para la última recurrencia. 2. **Diferencias significativas:** *, p – valor < 0.05; **, p – valor < 0.01 y ***, p – valor < 0.001.

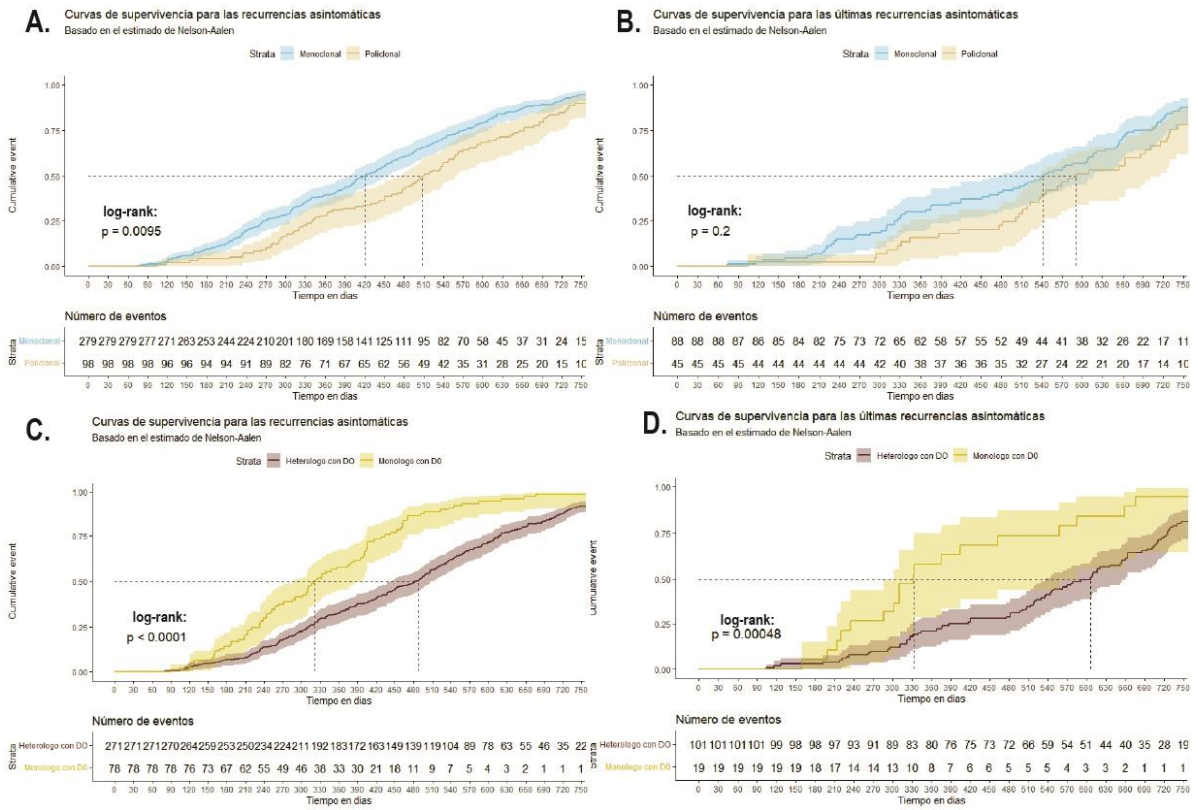


Anexo N°6: Diagrama de los escenarios de evolución de las recurrencias según multiplicidad de infección.

Anexo N°7: Análisis de factor de riesgo multivariado para la aparición de una recurrencia utilizando el modelo Cox CP

Todas las Recurrencia		HR	Valor-P	95% IC
Variación de genotipos con el D0	Heterólogo		Referencia	
	Homólogo	1.49	<0.001	[1.19 - 1.9]
Multiplicidad de infección (MOI)	Monoclonal		Referencia	
	Policlonal	0.84	0.182	[0.65 - 1.1]
Edad	Menos de 5 años		Referencia	
	De 6 a 15 años	1.04	0.806	[0.78 - 1.4]
	De 16 a 60 años	0.85	0.232	[0.65 - 1.1]
	Mayor de 60 años	1.07	0.738	[0.71 - 1.6]
Presencia de gametocitos en el D0	Negativo		Referencia	
	Positivo	0.83	0.054	[0.69 - 1.0]
Sexo	Femenino		Referencia	
	Masculino	1.2	0.038	[1.01 - 1.4]
Áreas de estudio	A1		Referencia	
	A2	1.03	0.829	[0.81 - 1.3]
	A3	0.8	0.103	[0.62 - 1.0]
	A4	0.9	0.374	[0.72 - 1.1]

1. Análisis de multivariado de COX CP (Counting Process), para evaluar factores asociados a recurrencias. Factor protector: HR<1, Factor de riesgo: HR>1.



Anexo N°8: Curvas de riesgo de Nelson – Aalen según multiplicidad de infección y variabilidad en los genotipos en episodios asintomáticos.

A y B: Curva de riesgo según multiplicidad de infección. C y D: curvas de riesgo según variabilidad en los genotipos de las recurrencias con el D0.