



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

“ASOCIACIÓN ENTRE INFECCIONES  
SUBMICROSCÓPICAS POR  
*PLASMODIUM VIVAX* Y LA PRESENCIA  
DE GAMETOCITOS DETECTADOS POR  
RT-qPCR EN EL DISTRITO DE MAZÁN  
EN LA AMAZONÍA PERUANA”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAESTRA EN  
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

NOELIA STEPHANIE CORONADO  
BARRIOS

LIMA-PERÚ

2021



**Asesora**

Dionicia Baziliza Gamboa Vilela, MSc., PhD.

**Jurado de Tesis**

PRESIDENTE

Jorge Luis Arévalo Zelada, PhD.

VOCAL

Mónica Jehnny Pajuelo Travezaño, PhD.

SECRETARIO (A)

Melissa Marlene Méndez Aranda, PhD.

## **Dedicatoria**

*A mis padres y abuelos, por su amor y aliento.*

## Agradecimientos

Mi gratitud a mi asesora, la Dra. Dionicia Gamboa, por su apoyo en la realización del presente trabajo. Su orientación me ayudó a alcanzar mi objetivo, logrando mejorar mi profesionalismo en todo este tiempo de investigación, a pesar de los tiempos difíciles que atraviesa la humanidad. También expreso mi gratitud al Dr. Joe Vinetz por brindarme la oportunidad de seguir con el posgrado y continuar mi formación científica. Agradecer a la Dra. Jan Conn y la Dra. Marta Moreno por introducirme en la investigación de la malaria en mosquitos. A Juan José Contreras y Berónica Infante por su apoyo durante la ejecución del proyecto. A Elizabeth Villasis por el entrenamiento en el manejo de cultivo de *Plasmodium*. A Luis Cabrera y Roberson Ramirez por sus observaciones críticas en el presente trabajo y a los miembros del Laboratorio de Malaria y de la Unidad de Epidemiología Molecular por compartir conmigo enriquecedoras experiencias de aprendizaje y emotivos momentos de confraternidad. A los doctores Ángel Rosas, Gabriel Carrasco, Katherine Torres por sus valiosas sugerencias en el análisis de datos y manuscrito final.

Finalmente, agradezco a mis padres Clara y Jesús por siempre depositar su confianza en mí, por su apoyo y su cálido amor a lo largo de mi vida. A mis amigos y colegas, Anthony, Manuel, Jorge, Jessica, Sammy, Flor, Pauline y Vanessa por su amistad.

### **Fuente de financiamiento**

Este trabajo de investigación se realizó con el apoyo financiero del Fondo de Entrenamiento NIH-Fogarty: “Traslational Reserach Development for Endemic Infectious Diseases of Amazonia”. Número de financiamiento: 2D43TW007120-11A1 y la Cooperación Belga para el Desarrollo (DGD) del Gobierno Belga en el marco del Tercer Acuerdo Marco de la Colaboración Institucional entre el Instituto de Medicina Tropical “Alexander von Humboldt”- Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima e Instituto de Tropical Medicina en Amberes, Bélgica (proyecto FA4).

## TABLA DE CONTENIDO

<b>I</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>II</b>	<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN</b> .....	<b>6</b>
	<i>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</i> .....	<i>6</i>
	<i>JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN</i> .....	<i>7</i>
<b>III</b>	<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>9</b>
3.1	Malaria .....	9
3.2	Ciclo biológico de la malaria y de <i>P. vivax</i> .....	11
3.3	Gametocitos y transmisión .....	13
3.4	Diagnóstico de gametocitos .....	14
3.5	Heterogeneidad del reservorio asintomático submicroscópico .....	15
3.6	Importancia de las infecciones submicroscópicas .....	18
3.7	Persistencia de las infecciones submicroscópicas no tratadas en zonas de baja transmisión .....	19
<b>IV</b>	<b>PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
<b>V</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
5.1	Diseño de estudio .....	23
5.2	Diseño experimental .....	25
5.3	Lugar de estudio .....	27
5.4	Población del estudio matriz y muestra del presente estudio .....	30
5.5	Consideraciones éticas .....	32
5.6	Data sociodemográfica .....	32
5.7	Análisis de resultados .....	33

<b>5.8</b>	<b>Detección y cuantificación de gametocitos en infecciones por <i>P. vivax</i></b> .....	<b>37</b>
5.8.1	Extracción de ARN usando Qiagen's RNeasy Mini Kit .....	37
5.8.2	Tratamiento del ARN con ADNasa .....	38
5.8.3	PCR cuantitativo en tiempo real de transcripción inversa (RT-qPCR) .....	39
<b>5.9</b>	<b>Plan de análisis</b> .....	<b>41</b>
<b>VI</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>44</b>
<b>6.1</b>	<b>Fase I: Descripción del reservorio de gametocitos en cuatro comunidades de la Amazonía peruana.</b> .....	<b>44</b>
6.1.1	Prevalencia de infección y gametocitos de <i>P. vivax</i> en 4 comunidades del distrito de Mazán .....	44
6.1.2	Proporción de gametocitos en infecciones por <i>P. vivax</i> estratificadas por rangos de edades .....	49
6.1.3	Densidad de las parasitemias y gametocitos por rangos de edades.....	53
6.1.4	Infecciones submicroscópicas y asintomáticas por <i>P. vivax</i> con gametocitos .....	53
<b>6.2</b>	<b>Fase II: Exploración de la asociación entre la persistencia submicroscópico y la presencia de gametocitos</b> .....	<b>55</b>
6.2.1	Descripción de los individuos con infección submicroscópica incluidos en el presente estudio .....	55
6.2.2	Mayor proporción de gametocitos en individuos con infecciones submicroscópica persistentes que en no persistentes por <i>P. vivax</i> .....	56
6.2.3	No se observó diferencias entre densidad de gametocitos en infecciones submicroscópicas no persistentes en comparación con infecciones persistentes por <i>P. vivax</i> .59	
6.2.4	No se observó una tendencia definida a disminuir la densidad de gametocitos en el curso de los episodios submicroscópicas persistentes por <i>P. vivax</i> .....	63
6.2.5	Gametocitos: Factor pronóstico de al menos 10 días más de infección submicroscópica por <i>P. vivax</i> .....	66
<b>VII</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>68</b>
<b>VIII</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>83</b>
<b>IX</b>	<b>LIMITACIONES</b> .....	<b>84</b>
<b>X</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>86</b>

## Índice de figuras:

<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida del parásito <i>Plasmodium vivax</i> .....	<b>13</b>
<b>Figura 2.</b> Trayectorias de infecciones hipotéticas para la infección submicroscópica. RDT, prueba de diagnóstico rápido; NAAT, técnicas de amplificación de ácidos nucleicos.....	<b>19</b>
<b>Figura 3.</b> Diseño del estudio matriz y presente estudio. ....	<b>25</b>
<b>Figura 4.</b> Flujograma del diseño experimental del estudio matriz y el presente estudio. ....	<b>27</b>
<b>Figura 5.</b> Ubicación espacial de las comunidades de Gamitanacocha (GC, círculos verdes), Libertad (LI, círculos azules), Primero de Enero (PE, círculos amarillos) y Urco Miraño (UM, círculos rojos) en el distrito de Mazán, Departamento de Loreto, Amazonía peruana.....	<b>29</b>
<b>Figura 6.</b> Flujograma de la distribución de la población del estudio matriz y muestra del presente estudio.....	<b>31</b>
<b>Figura 7.</b> Infecciones y gametocitos por <i>P. vivax</i> en cuatro comunidades del distrito de Mazán, Loreto; en una cohorte de cuatro barrios de Junio-Julio del 2015. ....	<b>48</b>
<b>Figura 8.</b> Infecciones y gametocitos por <i>P. vivax</i> estratificadas por edad en cuatro comunidades del distrito de Mazán, Loreto; en una cohorte de cuatro barrios de Junio-Julio del 2015. ....	<b>52</b>
<b>Figura 9.</b> Comparación de la densidad parasitaria y gametocitaria de las infecciones positivas a <i>P. vivax</i> según rango de edad. ....	<b>53</b>
<b>Figura 10.</b> Infecciones submicroscópicas y asintomáticas por <i>P. vivax</i> con gametocitos por RT-qPCR en cuatro comunidades del distrito de Mazán, Loreto. ....	<b>55</b>
<b>Figura 11.</b> Comparación de la mediana de la densidad de gametocitos en persistentes y no persistentes. ....	<b>62</b>
<b>Figura 12.</b> Cambio de la densidad de gametocitos en el curso de la infección submicroscópica persistente por <i>P.vivax</i> .. ....	<b>65</b>

### **Índice de tablas:**

<b>Tabla 1.</b> Características de los individuos con infección submicroscópica persistente y no persistente por <i>P. vivax</i> . .....	58
<b>Tabla 2.</b> Análisis univariado y multivariado para el riesgo de infección submicroscópica persistente por <i>P. vivax</i> utilizando regresión logística. ....	67

### **Índice de anexos:**

<b>Anexo 1.</b> Criterios de inclusión y exclusión de individuos con infección submicroscópica por <i>P. vivax</i> .	
<b>Anexo 2.</b> Criterios para caracterizar ausencia y presencia de gametocitos en individuos con infección persistente y no persistente submicroscópica por <i>P. vivax</i>	
<b>Anexo 3.</b> Componentes de la reacción de tratamiento de ARN con ADNsa para la digestión de una muestra.	
<b>Anexo 4.</b> Primers y sondas específicas de gametocito pfs25 y pvs25 RT-qPCR.	
<b>Anexo 5.</b> Volúmenes RT + RT- y Mastermix para una reacción.	
<b>Anexo 6.</b> Condiciones de ciclado de la reacción RT-qPCR.	
<b>Anexo 7.</b> Descripción de las infecciones submicroscópicas no persistentes y persistentes por <i>P. vivax</i> diagnosticadas por qPCR durante 4 barridos de DAC en el distrito de Mazán, Loreto.	
<b>Anexo 8.</b> Distribución de individuos con al menos una infección por <i>P. vivax</i> por qPCR y microscopía según su tipo de infección.	

## Resumen

Las infecciones submicroscópicas son frecuentes reservorios de gametocitos en zonas de baja transmisión de la malaria. Los gametocitos son el único estadio del parásito que ocasiona la malaria requerido para la transmisión del humano al mosquito vector. Se ha reportado que las infecciones submicroscópicas pueden persistir en el tiempo y podrían mantener la transmisión. No obstante, la persistencia de infecciones submicroscópicas por *P. vivax* ha sido poco estudiada, así como la presencia y cuantificación de gametocitos en estas infecciones. Se requiere una mejor comprensión de la transmisión submicroscópica persistente para planificar, supervisar y evaluar las intervenciones a nivel comunitario en zonas de baja transmisión como la Amazonía peruana.

En este estudio, se estimó la prevalencia de gametocitos en las infecciones de *P. vivax* de una cohorte del distrito de Mazán, Loreto, durante la temporada de alta transmisión Junio-Julio del 2015. El monitoreo molecular se realizó por RT-qPCR, específico de la etapa de gametocito. Luego, se exploró la persistencia de la infección submicroscópica en cuatro barridos consecutivos de detección activa de casos (DAC) con intervalos de 10 días en cuatro comunidades ribereñas. Finalmente, se evaluó la presencia de gametocitos y características sociodemográficas (de relevancia epidemiológica en malaria) como factores pronósticos asociados a la persistencia de infección en individuos con infección de al menos 10 días de duración submicroscópica por *P. vivax*.

Las infecciones submicroscópicas representaron el 85.7% de las infecciones por *P. vivax*. Se encontraron gametocitos en 42.5% (n=243/572, rango por barrido 31.6%-58.8%) de las infecciones por *P. vivax*. El 52.7% de todas las infecciones *P. vivax* con gametocitos eran submicroscópicas y asintomáticas. La mayor proporción de infecciones con gametocitos se encontró en el rango de edad 15-39 años de edad. Sin embargo, para cada comunidad la proporción máxima varió según rango de edad: De 5-14 años en Libertad y Urco Miraño, mayores a 40 años en Gamitanacocha y 15-39 años en Primero de Enero. La mayor densidad de gametocitos fue en niños menores de 5 años. La presencia de gametocitos en una infección resultó ser un factor pronóstico de al menos 10 días más de infección submicroscópica persistente por *P. vivax* en el análisis multivariado (*odds ratio*: 3.23 [intervalo de confianza del 95%: 1.57; 6.67];  $p < 0,001$ ). Se corrobora una vez más que las infecciones submicroscópicas y asintomáticas predominan y contribuyen al reservorio de gametocitos en la Amazonía peruana. Además, se postula la presencia de gametocitos en infecciones submicroscópicas persistentes como marcador pronóstico de persistencia. Esto ayudaría a identificar aquellas poblaciones susceptibles a desarrollar persistencia submicroscópica por *P. vivax* con el potencial de mantener la transmisión, lo que ayudaría a focalizar las estrategias de control y eliminación de la malaria.

**Palabras claves:**

*Plasmodium vivax*; Infección submicroscópica persistente, gametocito, RT-qPCR.

## **Abstract**

Submicroscopic infections are frequent reservoirs of gametocytes in areas of low malaria transmission. Gametocytes are the only stage of the malaria parasite required for transmission from human to mosquito vector. It has been reported that submicroscopic infections can persist over time and may maintain malaria transmission. However, the persistence of submicroscopic *P. vivax* infections has been poorly studied, as well as the presence and quantification of gametocytes in these infections. A better understanding of persistent submicroscopic transmission is required to plan, monitor, and evaluate community-level interventions in low-transmission areas such as the Peruvian Amazon.

In this study, we determined the prevalence of gametocytes in *P. vivax* infections in a cohort from Mazán district, Loreto, during the high transmission season (June-July 2015). Molecular monitoring was performed by RT-qPCR, specific to the gametocyte stage. Then, the persistence of submicroscopic infection was explored in four consecutive active case detection (ACD) screening at 10-day intervals in four riverine communities. Finally, the presence of gametocytes and sociodemographic characteristics (of epidemiological relevance in malaria) were evaluated as prognostic factors associated with persistence of infection in individuals with submicroscopic *P. vivax* infection of at least 10 days duration.

Submicroscopic infections accounted for 85.7% of *P. vivax* infections. Gametocytes were found in 42.5% (n=243/572, range per sweep 31.6%-58.8%) of *P. vivax* infections. Fifty-two point seven percent of all *P. vivax* infections with gametocytes were submicroscopic and asymptomatic. The highest proportion of infections with gametocytes was found in those older than 5 years. However, for each community the maximum proportion varied according to age range: 5-14 years in Libertad and Urco Miraflores, older than 40 years in Gamitanacocha and 15-39 years in Primero de Enero. The presence of gametocytes in an infection was a predictor of at least 10 more days of persistent submicroscopic *P. vivax* infection in the multivariate analysis (*odds ratio*: 3.23 [95% confidence interval: 1.57; 6.67];  $p < 0.001$ ). It is corroborated once again that submicroscopic and asymptomatic infections predominate and contribute to the gametocyte reservoir in the Peruvian Amazon. Furthermore, the presence of gametocytes in persistent submicroscopic infections is postulated as a prognostic marker of persistence. This would help to identify those populations susceptible to develop submicroscopic persistence by *P. vivax* with the potential to maintain transmission, which would help to focus malaria control and elimination strategies.

**Keywords:**

*Plasmodium vivax*; Persistent submicroscopic infection, gametocyte, RT-qPCR.



## I Introducción

Para lograr la eliminación de la malaria es necesario dirigirse al reservorio humano de la infección, incluyendo al importante reservorio submicroscópico de *Plasmodium sp.* que la vigilancia de rutina pasa desapercibida; pero que podría contribuir a la transmisión de la malaria<sup>1</sup>. Se tiene información que a diferencia de muchos entornos africanos, la mayoría de las infecciones asintomáticas son submicroscópicas en zonas como el Sudeste Asiático y en la Amazonía<sup>1</sup>.

Estudios en Vietnam han puesto en evidencia que las infecciones submicroscópicas pueden convertirse en infecciones con densidades mucho más altas en un momento posterior<sup>2</sup>. En Brasil se ha reportado que las infecciones submicroscópicas no tratadas pueden persistir durante varias semanas sin evolucionar hacia la enfermedad clínica<sup>3</sup>. Esto demuestra los diferentes cursos que podría tomar una infección submicroscópica: persistir por periodos largos o cortos de tiempo con fluctuaciones de las densidades parasitarias por debajo del límite de detección por microscopía; volverse sintomáticas días o semanas después, resolverse espontáneamente (o, al menos, volverse indetectables por pruebas moleculares) o persistir sin síntomas por semanas o meses<sup>4</sup>. Todo lo mencionado anteriormente incrementa el interés en investigar sobre la contribución de las infecciones asintomáticas y submicroscópicas, así como el de las infecciones submicroscópicas persistentes a la transmisión de la malaria (prevalencia,

dinámica e infectividad), sobre todo en zonas donde los niveles de transmisión son heterogéneos a escala local.

Las infecciones submicroscópicas juegan un papel importante para mantener la transmisión de la malaria, ya que pueden albergar gametocitos femeninos y masculinos, estadios sexuales del parásito capaces de fertilizarse dentro del mosquito hembra del género *Anopheles* (*Nyssorhynchus*)<sup>5-7</sup>. Si bien la proporción de gametocitos en las infecciones submicroscópicas puede ser más baja que en las infecciones microscópicas, la persistencia de estas infecciones puede contribuir significativamente a la transmisión y propagación de la infección en un momento posterior<sup>8</sup>. Se ha sugerido una relación sigmoidea entre la infectividad del hospedero a los mosquitos y la densidad de gametocitos, con una variación significativa en los niveles de infectividad a bajas densidades de gametocitos<sup>9-11</sup>. Otro estudio que examinó ensayos de infectividad de mosquitos en zonas de baja transmisión, reportó que las infecciones submicroscópicas podrían ser potencial fuente del 20%-50% de todas las transmisiones entre humanos y mosquitos<sup>8</sup>. No obstante, los ensayos que evalúan la infectividad del hospedero a los mosquitos en grandes estudios epidemiológicos representan un reto logístico y técnico. Por lo tanto, la presencia y densidad de gametocitos se utiliza como un sustituto para describir el reservorio infeccioso en los estudios epidemiológicos moleculares (teniendo en cuenta que el éxito de la infección de los mosquitos puede estar modulada por la variación interindividual de factores del mosquito, el parásito y el hospedero)<sup>10,12</sup>

Por otro lado, se requiere una mejor comprensión de los factores pronóstico de la duración de una infección submicroscópica que permita identificar si la población es susceptible a desarrollar persistencia submicroscópica con el potencial de mantener la transmisión, lo que puede mejorar las estrategias de intervención de control y eliminación de la malaria. Una variedad de factores podría afectar el pronóstico de duración de una infección submicroscópica. En este estudio se explora la presencia de gametocitos, precursor de los estadios asexuales del parásito, en las infecciones submicroscópicas como factor pronóstico de persistencia. Factor pronóstico identificado por su relación con la condición fisiológica del parásito asexual<sup>13,14</sup>.

Se ha sugerido que parásitos asexuales en buena condición fisiológica ("estado") y/o con abundantes recursos pueden permitirse invertir en gametocitos, pero a medida que su condición fisiológica se deteriora (por ejemplo, debido al envejecimiento del parásito o al deterioro del entorno) desvían los recursos de la reproducción hacia el mantenimiento y la supervivencia (replicación asexual), una estrategia denominada "restricción reproductiva" que aumenta la probabilidad de supervivencia hasta que el entorno o el estado mejore, aumentando así la probabilidad de reproducción futura. Sin embargo, si el estado se deteriora tanto que la supervivencia en el huésped se vuelve improbable y las perspectivas de reproducción futura son sombrías, los parásitos priorizarían la asignación de recursos a la reproducción, una estrategia denominada "inversión terminal". Sin embargo, la inversión terminal puede ser difícil para el parásito, ya que

al estar en mal estado el nivel de producción reproductiva puede ser bajo, a pesar de haber invertido todo lo que podía. Por ende, un deterioro drástico del estado del parásito podría terminar la infección, mientras que un buen estado o un deterioro leve del parásito asexual, reflejado en la presencia de gametocito en la infección submicroscópica, pronosticaría persistencia.

En la Amazonía peruana, se ha informado del predominio de las infecciones asintomáticas submicroscópicas como reservorio de gametocitos de *P. vivax*<sup>15</sup>. Asimismo, se ha reportado que las infecciones submicroscópicas suelen volverse indetectables en el tiempo, y una minoría se vuelven detectables por microscopía<sup>16</sup>. Estos hallazgos revelan la existencia de individuos con infecciones submicroscópicas portadoras de gametocitos que se están resolviendo de forma espontánea. Surge la curiosidad sobre la persistencia de las infecciones submicroscópicas por *P. vivax* en la Amazonía, así como la producción de los gametocitos a lo largo de este tiempo que podría ser capaz de infectar mosquitos, y si la presencia de gametocito podría ser un buen factor pronóstico de persistencia submicroscópica.

En este estudio, mediante el monitoreo molecular por RT-qPCR, específico de la etapa de gametocitos, se determinó la prevalencia de gametocitos en las infecciones por *P. vivax* de una cohorte del distrito de Mazán, Loreto. Se examinó la persistencia de las infecciones submicroscópicas en cuatro barridos consecutivos de detección activa de casos (DAC) con intervalos de 10 días en cuatro comunidades ribereñas, y se evaluó la asociación entre la

presencia de gametocitos y la persistencia de infecciones submicroscópicas por *P. vivax*.

## II Planteamiento del problema y justificación de la investigación

### *Planteamiento del problema*

Estudios en la Amazonía han reportado que las infecciones submicroscópicas asintomáticas por *P. vivax* pueden persistir durante varias semanas<sup>3,17-19</sup>. Así mismo, una revisión sistemática de 7 cohortes realizada por Slater *et al.* indicó que las infecciones submicroscópicas por *P. falciparum* en África podrían ser de larga duración<sup>20</sup>. No obstante, los autores de esta revisión presentaron limitaciones para estimar la duración de las infecciones submicroscópicas, ya que la periodicidad de los seguimientos fue distinta en cada cohorte, y en algunas de ellas se administró tratamiento cuando el individuo presentó la infección. También, se ha sugerido que la duración de estas infecciones submicroscópicas por *P. vivax* en la Amazonía podrían ser mucho más cortas que las infecciones submicroscópicas por *P. falciparum* en África<sup>1</sup>.

Estos hallazgos han suscitado mayor interés por entender cuál es contribución al mantenimiento de la transmisión de las infecciones submicroscópicas persistentes sobre todo en zonas de baja transmisión a medida que se avanza hacia la eliminación de la malaria. La importancia de las infecciones submicroscópicas radica en que contribuyen a un importante reservorio infeccioso para la transmisión continua<sup>6,7,11</sup>. Individuos con infección submicroscópica resultan ser aproximadamente un tercio más infecciosos para los mosquitos que los individuos con infección detectable por microscopía<sup>20</sup>.

Hace falta un mayor entendimiento del rol que cumplen las infecciones submicroscópicas persistentes en la transmisión. Por este motivo, en el presente estudio se caracterizó al reservorio infeccioso de la malaria en la Amazonía peruana, se exploró la persistencia en infecciones submicroscópicas por *P. vivax* y se evaluó si la presencia de gametocitos podría servir como factor pronóstico de la continuidad de la persistencia, así como la relación entre factores sociodemográficos que podrían estar involucrados.

#### *Justificación de la investigación*

Debido a la poca información sobre el rol de las infecciones submicroscópicas persistentes por *P. vivax* en la transmisión de la malaria en la Amazonía peruana, este estudio describió el reservorio infeccioso de la malaria en cuatro comunidades del distrito de Mazán, Loreto; exploró el reservorio submicroscópico persistente y evaluó la presencia de gametocitos en infección como posibles factores pronósticos de continuidad de la persistencia submicroscópica. Un mayor entendimiento de la contribución de estas infecciones al reservorio infeccioso podría determinar si su eliminación es esencial, además de comprender las consecuencias de una cobertura imperfecta de las intervenciones de control, lo que debe llevar a contribuir a un mejor diagnóstico, tratamiento y seguimiento de individuos submicroscópicos de la Amazonía Peruana. Además, de proponer el diagnóstico de gametocitos en infecciones submicroscópicas como marcador de persistencia de infección. Es necesario identificar poblaciones

susceptibles a desarrollar infecciones submicroscópicas persistentes para focalizar las estrategias de control y eliminación de la malaria.

### III Marco Teórico

#### 3.1 Malaria

La malaria es causada por múltiples especies parasitarias del género *Plasmodium sp.*, es endémica en 87 países. La OMS (Organización Mundial de la Salud) en el 2019 estimó 229 millones de casos y 435 000 muertes relacionadas con esta enfermedad<sup>21</sup>, cifra que se ha mantenido bastante estable desde el 2015, lo que indica que el progreso de la eliminación se ha estancado. Es necesario identificar a las personas con probabilidad de mantener la transmisión para reducir aún más la prevalencia de la malaria. La enfermedad en humanos es causada por la picadura de un mosquito hembra del género *Anopheles (Nyssorhynchus) sp.*, la cual inyecta el parásito en su estadio infectivo al torrente sanguíneo<sup>22</sup>.

Existen 5 especies que causan la infección en humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi* (con poca frecuencia). *P. falciparum* es la especie dominante en la mayor parte de África, mientras que *P. vivax* es la especie más dispersa geográficamente y la más común en Sudamérica, y es reconocida cada vez más como una fuente importante de carga clínica y socioeconómica<sup>20</sup>.

Las características biológicas únicas de *P. vivax* hacen que responda menos a las medidas de control de rutina y se favorezca su transmisión<sup>22,23</sup>. Entre estas características resaltan 1) su capacidad para desarrollarse en el mosquito a bajas temperaturas (hasta 14.5°C ) que le

confiere un mayor rango de distribución y resistencia a los cambios ecológicos, 2) la producción temprana y continua de gametocitos, lo que permite la transmisión antes de la manifestación de los síntomas clínicos (producción de gametocitos en simultáneo a la primera replicación asexual), 3) su tropismo por los reticulocitos que suele causar infecciones de baja parasitemia y lo más importante, 4) su estadio latente residente en el hígado (hipnozoito), que genera recaídas y hace difícil que las pruebas de diagnóstico actuales puedan detectarlas y tratarlas.

En las últimas dos décadas, el uso de técnicas moleculares sensibles ha demostrado el predominio de las infecciones asintomáticas y/o submicroscópicas en la gran mayoría de entornos endémicos de malaria. Asimismo, estudios de alimentación por membrana han revelado que individuos infectados con densidades de parásitos submicroscópica resultan ser aproximadamente un tercio más infecciosos para los mosquitos que los individuos con infección microscópica<sup>20</sup>. Estos resultados indican que las infecciones submicroscópicas contribuyen al reservorio infeccioso. Sin embargo, aún no hay pruebas directas que atacar específicamente este reservorio de parásitos de baja densidad acelere el progreso hacia la eliminación<sup>10,24</sup>.

### 3.2 Ciclo biológico de la malaria y de *P. vivax*

Todas las especies de *Plasmodium* que causan la malaria en humanos se transmiten por la picadura del mosquito hembra del género *Anopheles*. Tiene un ciclo de vida complejo que se divide en tres fases:

i) La fase exo-eritrocitaria que se da en el hígado y se inicia cuando el mosquito infectado inocula esporozoitos en el momento de la picadura al humano. Alrededor de 8-39 esporozoitos, estadio infectivo, migran por el torrente sanguíneo en 30 minutos hasta llegar al hígado e invadir los hepatocitos<sup>25</sup>. En las células del hígado, una proporción de los esporozoitos invasores se diferencian en esquizontes hepáticos que después de 8 días se lisan para liberar 2,000 a 40,000 merozoitos maduros<sup>22,25</sup>. Estos pueden seguir invadiendo más células del hígado o dirigirse al torrente sanguíneo para infectar reticulocitos (glóbulos rojos inmaduros) e iniciar el ciclo asexual en la sangre. En el caso de *P. vivax*, pueden permanecer por un periodo inactivo en estadio de hipnozoito (estadio latente) alrededor del tercer día después de la infección, y puede reactivarse después de varias semanas, meses o años, convirtiéndose en el responsable de las recaídas o infecciones recurrentes<sup>22</sup>.

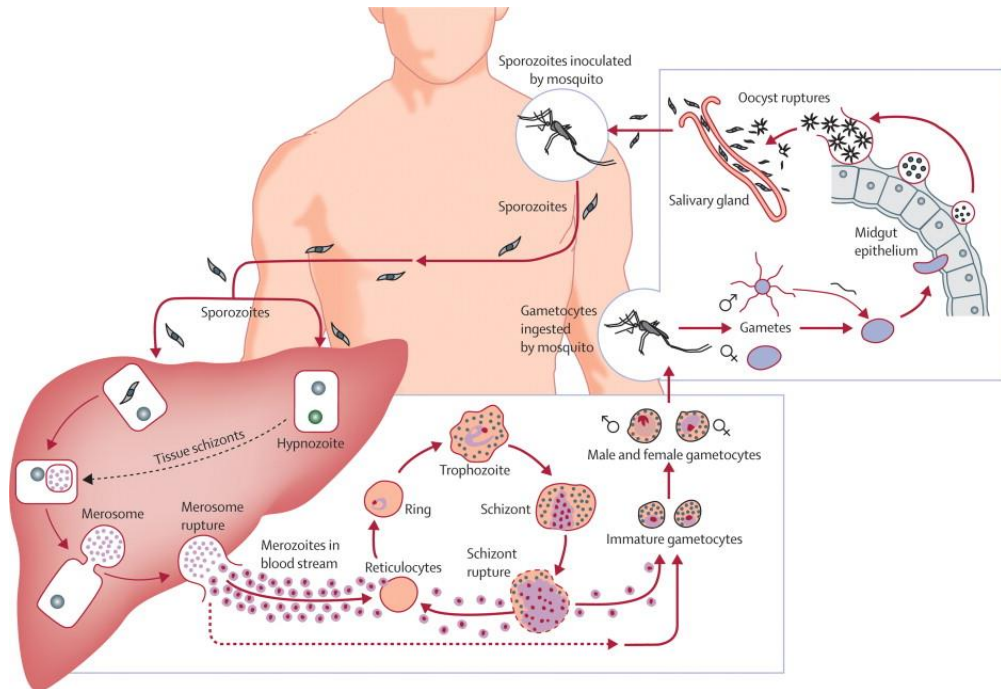
ii) La fase eritrocitaria inicia con el ingreso del merozoito al glóbulo rojo (*P. vivax* solo invade reticulocitos, glóbulos rojos inmaduros), donde se diferencia en una célula uninucleada denominada trofozoito inmaduro el cual tiene la forma de anillo. Posteriormente el núcleo del trofozoito se divide asexualmente para producir un esquizonte sanguíneo, que contiene entre 10 a 36 merozoitos mononucleados<sup>25</sup>.

Debido al deterioro del glóbulo rojo por la reproducción del parásito en su interior, este se lisa y libera la primera generación de merozoitos al torrente sanguíneo, causando fiebre y escalofríos en el hospedero. La mayoría de los nuevos merozoitos reinician otra ronda del ciclo replicativo infectando nuevos reticulocitos cada 48 horas aproximadamente<sup>26</sup>. Mientras una pequeña proporción (~10%) abandona el ciclo de multiplicación asexual y se diferencia en gametocitos inmaduros<sup>27</sup>.

El desarrollo de gametocitos en *P. vivax* puede comenzar con la primera generación de merozoitos y puede verse en circulación periférica antes o al comienzo de los síntomas clínicos. Su maduración sexual tarda entre 2-3 días y se subdivide en 5 etapas morfológicamente diferenciadas (etapa I-V), siendo la etapa V la que muestra diferencias marcadas entre gametocitos masculinos y femeninos (proporción sexual 1:4), los cuales sobreviven 3 días más<sup>28</sup>. Los gametocitos maduros (etapa V), estadio sexual del parásito, son infecciosos para los mosquitos que los ingieren mientras se alimentan y dan inicio a la fase esporogónica.

iii) La fase esporogónica se lleva a cabo en el intestino del mosquito, los eritrocitos infectados se lisan liberando a los gametocitos en el umbral del intestino para iniciar su maduración en gametos masculino y femenino (4-8 microgametos por cada gametocito masculino y 1 macrogameto por cada gametocito femenino)<sup>29</sup>. La fertilización de ambos gametos produce un cigoto diploide, que se desarrolla en ooquinetos motiles, este estadio del parásito penetra la pared intestinal y se

convierte en ooquiste después de 7 a 9 días de una comida de sangre infecciosa. Cada ooquiste tarda entre 8 a 15 días en crecer, luego se rompe y libera una nueva generación de 1500 y 5000 esporozoitos infecciosos que alcanzan la glándula salival del mosquito, listos para ser depositados en un nuevo hospedero en una nueva comida de sangre<sup>30</sup>.



**Figura 1. Ciclo de vida del parásito *Plasmodium vivax* (Tomado de Mueller et al. 2009).**

### 3.3 Gametocitos y transmisión

La conversión sexual y el correcto desarrollo de los gametocitos son esenciales para la transmisión de la malaria. Los parásitos de la malaria se someten a un número indefinido de ciclos de replicación asexual dentro de los glóbulos rojos. Durante cada uno de estos ciclos de desarrollo intraeritrocítico, una pequeña proporción de parásitos se desvía de la replicación asexual e inicia el desarrollo en células precursoras sexuales en un proceso conocido como conversión sexual.

Estas células precursoras sexuales se denominan gametocitos, y son en la madurez el único estadio parasitario capaz de establecer una infección en el mosquito vector<sup>31</sup>.

Existen diferencias entre las infecciones por *P. vivax* y *P. falciparum* con respecto a la aparición de gametocitos en sangre periférica. Mientras que los gametocitos infecciosos de *P. falciparum* sólo aparecen en circulación sanguínea de forma tardía, entre 10 y 14 días después de la aparición de los síntomas clínicos, los gametocitos de *P. vivax* aparecen casi simultáneamente a la primera replicación asexual. Por lo tanto, es poco probable que los casos de *P. falciparum* transmitan la infección antes del inicio del tratamiento, pero esto no es necesariamente así en muchos casos de *P. vivax*<sup>32</sup>.

### **3.4 Diagnóstico de gametocitos**

Los gametocitos pueden ser diagnosticados por microscopía y PCR. Sin embargo, la limitada sensibilidad de la microscopía ha obstaculizado por mucho tiempo el diagnóstico de gametocitos en estudios poblacionales que comprenden en su mayoría infecciones asintomáticas de baja densidad<sup>31</sup>. Por otro lado, las pruebas moleculares representan una herramienta sensible para el diagnóstico de los transcritos de ARN específicos de los gametocitos que permiten examinar los gametocitos en infecciones de baja densidad<sup>12</sup>.

Hasta la fecha se han desarrollado una serie de marcadores moleculares para la detección de gametocitos mediante la PCR

cuantitativa de transcripción reversa (RT-qPCR) o la amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (QT-NASBA)<sup>33</sup>.

Entre los primeros marcadores descritos para la detección de gametocitos están el *pfs25* (PF3D7\_1031000)<sup>12,34</sup>, el *pfs16* (PF3D7\_0406200)<sup>35</sup> y el *pf377* (PF3D7\_1250100)<sup>36</sup> para *P. falciparum*, y el *pvs25* (PVX\_111175)<sup>12</sup> para *P. vivax*. *pfs25* y *pvs25* son los marcadores más usados en la actualidad y se expresan predominantemente o exclusivamente en los gametocitos femeninos.

En combinación con los marcadores específicos de los gametocitos femeninos, los marcadores específicos de los gametocitos masculinos: *pfs230p* (PF3D7\_0209000)<sup>34</sup>, *pf13*(PF3D7\_1311100)<sup>34</sup> y *PF3D7\_1469900*<sup>37</sup>, permiten determinar la proporción de sexos de los gametocitos en infecciones por *P. falciparum*. Esto es especialmente importante cuando se analizan fármacos que podrían afectar a los gametocitos masculinos y femeninos de forma diferencial<sup>38</sup>.

### **3.5 Heterogeneidad del reservorio asintomático submicroscópico**

El reservorio asintomático está compuesto por individuos con parasitemias submicroscópicas y microscópica, y su proporción puede variar en diferentes entornos endémicos. En entornos con alta a moderada transmisión, la mayor parte del reservorio asintomático está compuesto por parasitemias microscópicas; opuesto a los entornos de baja transmisión, donde la mayor parte de este reservorio está compuesto por parasitemias submicroscópicas<sup>1</sup>. Actualmente, se desconoce la

contribución de las parasitemias submicroscópicas en la transmisión en curso de la mayoría de los entornos.

La contribución del reservorio asintomático a la transmisión está mediada por la duración de la infección, la densidad de gametocitos y la infectividad del mosquito<sup>1</sup>. Durante mucho tiempo, estas características se han estudiado entre los individuos con malaria asintomática en entornos de transmisión moderada a alta como en África, donde se ha reportado frecuentemente que los individuos asintomáticos albergan parasitemias microscópicas con duración de semanas a meses<sup>2,39,40</sup> a causa de la inmunidad adquirida no estéril que mantiene la parasitemia y los síntomas bajo control sin lograr una eliminación completa<sup>41</sup>. En línea con lo mencionado anteriormente, el genotipado longitudinal de una cohorte en Ghana confirmó que las infecciones persistentes son producto de las mismas cepas con una media de 194 días, en lugar de representar una reinfección frecuente<sup>40</sup>. Aunque en este estudio no se midieron los gametocitos, reportan que es probable que estos individuos produjeran gametocitos y, por tanto, fueron infecciosos durante gran parte del tiempo. De hecho, las infecciones microscópicas asintomáticas han demostrado que pueden ser más infecciosas que la malaria sintomática<sup>10</sup>.

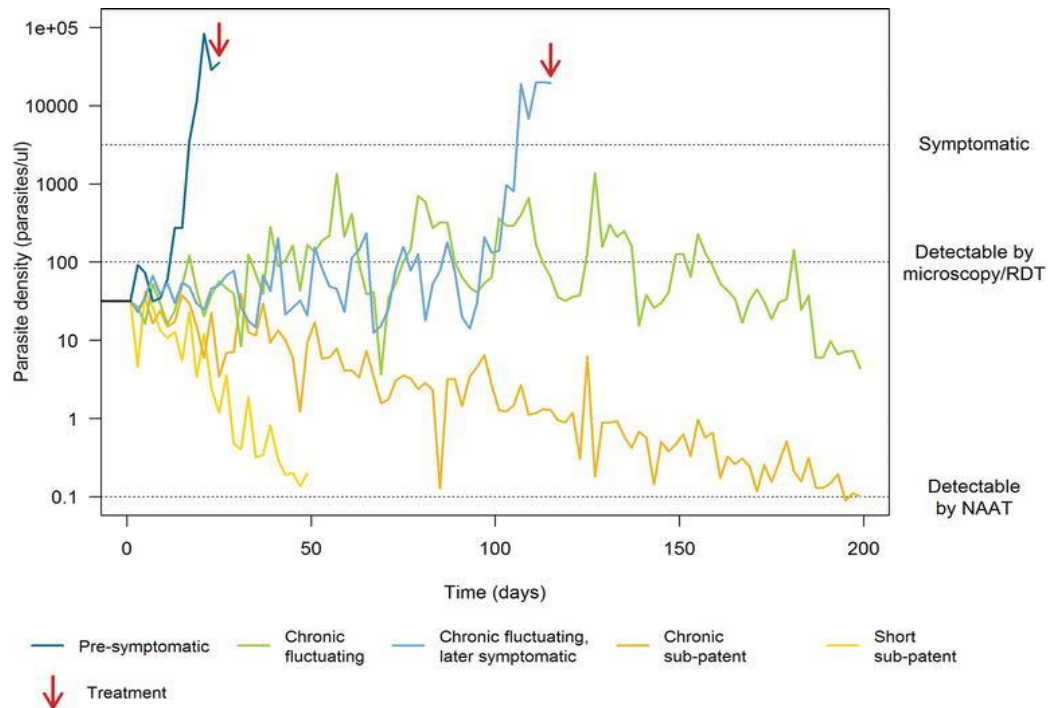
Por el contrario, determinar la contribución a la transmisión de infecciones asintomáticas en entornos de baja transmisión como la Amazonia y el Sudeste Asiático puede resultar un reto por varios motivos. *P. vivax* es más prevalente y suelen ser co-endémicas con *P. falciparum* y *P. vivax*. La mayoría de las infecciones son asintomáticas

submicroscópicas, a pesar que los residentes probablemente hayan desarrollado poca inmunidad protectora o supresora por pertenecer a zonas de baja endemicidad<sup>1</sup>. La evidencia hasta el momento no es consistente sobre la asociación entre los niveles de anticuerpos con las infecciones submicroscópicas, por lo que aún se sigue investigando el rol de la respuesta inmune en estas infecciones<sup>1</sup>.

### **3.6 Importancia de las infecciones submicroscópicas**

Las infección submicroscópica en un momento dado puede presentar una dinámica diferente de la parasitemia a lo largo del tiempo en infecciones individuales<sup>4</sup>. Podría mantenerse con una infección de baja densidad de larga duración o de corta duración, con una infecciosidad limitada para los mosquitos y sin desarrollar nunca síntomas, por lo tanto sin buscar tratamiento. El mismo individuo también podría estar infectado muy recientemente o experimentar un aumento más lento de la densidad del parásito hasta un nivel en el que se desarrollen los síntomas. Otro resultado posible es que la parasitemia fluctúe entre niveles detectables e indetectables por microscopía. Cualquiera de estos escenarios podría verse perturbado por la reinfección, que podría dar lugar a una infección asintomática continua o al desarrollo de síntomas<sup>4</sup>, Figura 2.

Cada una de estas grandes diferencias significa que el reservorio submicroscópico puede variar en diferentes entornos en cuanto a la persistencia de infección, producción de gametocitos e infectividad a lo largo del tiempo.



**Figura 2. Trayectorias de infecciones hipotéticas para la infección submicroscópica. RDT, prueba de diagnóstico rápido; NAAT, técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (Tomado de Drakeley et al, 2018).**

*Infección de baja densidad de larga duración (curva naranja) o de corta duración (curva amarilla), infección en la fase pre-sintomática (línea azul oscuro), infección lenta hasta desarrollar síntomas (línea celeste). Infección con parasitemias fluctuantes entre niveles detectables e indetectables por microscopía (línea verde).*

### **3.7 Persistencia de las infecciones submicroscópicas no tratadas en zonas de baja transmisión**

La duración de la infección asintomática submicroscópica en entornos de baja transmisión sigue siendo difícil de determinar. Las escasas evidencias sugieren que una minoría puede persistir durante varias semanas, pero la mayoría desaparece espontáneamente. Se tienen pruebas sobre la persistencia de la malaria por *P. vivax* asintomática en Brasil, donde se realizó un seguimiento durante 30 días a 16 personas

positivas a *P. vivax* por PCR con infección asintomática submicroscópica. Tres cuartas partes eran negativas a la PCR a las dos semanas, mientras que las cuatro restantes seguían siendo positivas a la PCR a los 30 días, y ninguna desarrolló síntomas<sup>17</sup>. Sin embargo, el estudio hace énfasis que no se pudo diferenciar si los casos persistentemente positivos correspondieron a infecciones de larga duración, reinfecciones o relapsos. En Colombia, se encontró que 100% de las infecciones asintomáticas y submicroscópicas detectadas permanecieron positivas hasta el día 28 de seguimiento sin desarrollo de síntomas<sup>18</sup>.

Se conoce poco sobre los factores que contribuyen a la duración de las infecciones submicroscópicas, pero es claro que la respuesta inmunológica del hospedador tiene un papel clave en el desarrollo de estas infecciones. Adicionalmente, factores intrínsecos del parásito; como la especie, la virulencia y la diversidad genética podrían influenciar en la persistencia<sup>42</sup>. El largo tiempo de maduración de gametocitos por *P. falciparum* podría dar lugar a infecciones de mayor duración en contraste a un corto tiempo de maduración de gametocitos por *P. vivax*. Se ha reportado que parásitos menos virulentos (replicación del estadio asexual) podrían persistir en baja densidad y ser menos inmunogénicos<sup>43</sup>. Además, se tiene evidencia que las infecciones producidas por múltiples clones persisten tres veces más en el tiempo que aquellas con un solo genotipo, sugiriendo que la diversidad genética favorece la persistencia de la infección<sup>44</sup>.

#### **IV Pregunta de Investigación y objetivos**

##### *Pregunta de investigación*

La persistencia de infecciones submicroscópicas por *P. vivax* ha sido poco estudiado, y menos aún la presencia de gametocitos en estas infecciones. Con un diseño prospectivo de comparación de proporciones, se explora la persistencia de las infecciones submicroscópicas por *P. vivax*, y la participación de gametocitos en la infección como factor pronóstico de persistencia submicroscópica.

##### *Objetivos*

##### **Objetivo general**

- Determinar la asociación entre la presencia de gametocitos y la persistencia submicroscópica por *P. vivax* en individuos con infección de al menos 10 días de duración submicroscópica por *P. vivax* del distrito de Mazán de la Amazonía Peruana.

##### **Objetivos específicos**

- Determinar la prevalencia de gametocitos femeninos maduros en individuos infectados por *P. vivax* de cuatro comunidades ribereñas de la Amazonía Peruana.
- Determinar la prevalencia de infecciones submicroscópicas persistentes y no persistentes por *P. vivax*.
- Comparar la densidad de gametocitos entre infecciones submicroscópicas persistentes y no persistentes por *P. vivax*.

- Explorar la asociación entre las características sociodemográficas y la persistencia submicroscópica por *P. vivax*.

## V Materiales y métodos

### 5.1 Diseño de estudio

El presente estudio parte de un estudio matriz tipo cohorte titulado “Estimación de la proporción de infecciones por malaria no detectadas por las intervenciones de detección activa de casos (DAC) en áreas endémicas de la Amazonía Peruana” (código SIDISI: 64371) a cargo del Instituto de Medicina Tropical “Alexander von Humboldt” y el Laboratorio de Malaria de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

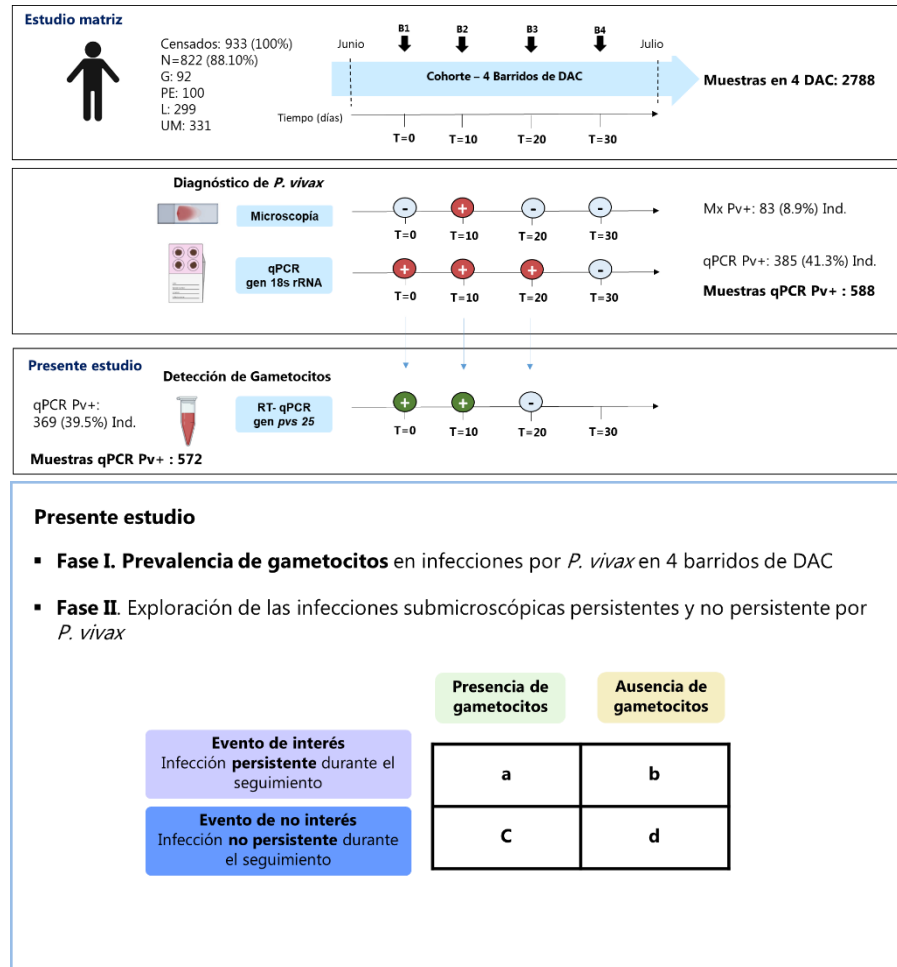
La estrategia de detección activa de casos (DAC) aplicada en el estudio matriz llevó a cabo 4 barridos de DAC (encuestas transversales consecutivas a intervalos de 10 días) entre Junio-Julio del 2015 con la finalidad de determinar la prevalencia de infección por *P. vivax* y *P. falciparum* por microscopía y qPCR.

El presente estudio es de tipo prospectivo de razón de proporciones dividido en dos fases: *i*) Determinación de la prevalencia de gametocitos en las infecciones de *P. vivax* en los 4 barridos de DAC y *ii*) Comparación de la presencia de gametocitos en infecciones submicroscópicas por *P. vivax* persistentes y no persistentes del distrito de Mazán de la Amazonía peruana.

La agrupación de individuos con infección submicroscópica por *P. vivax* persistente (evento de interés: individuo con PCR positivo a *P. vivax*, microscopía negativo más de una vez durante el seguimiento) e individuos con infección submicroscópica por *P. vivax* no persistente

(evento de no interés: individuo con un único PCR positivo a *P. vivax* entre barridos con PCR negativo durante el seguimiento, microscopía negativo) se realizó según los criterios de inclusión y exclusión establecidos para el presente estudio **Anexo 1**.

Luego, se evaluó la presencia de gametocitos (presencia o ausencia) en la proporción de individuos con infección submicroscópica persistente y no persistente. Finalmente, se comparó las proporciones con presencia y ausencia de gametocitos para determinar si la presencia de gametocitos en la infección submicroscópica por *P. vivax* es un factor pronóstico asociado a la persistencia sub-microscópica por *P. vivax* (**Figura 3**).



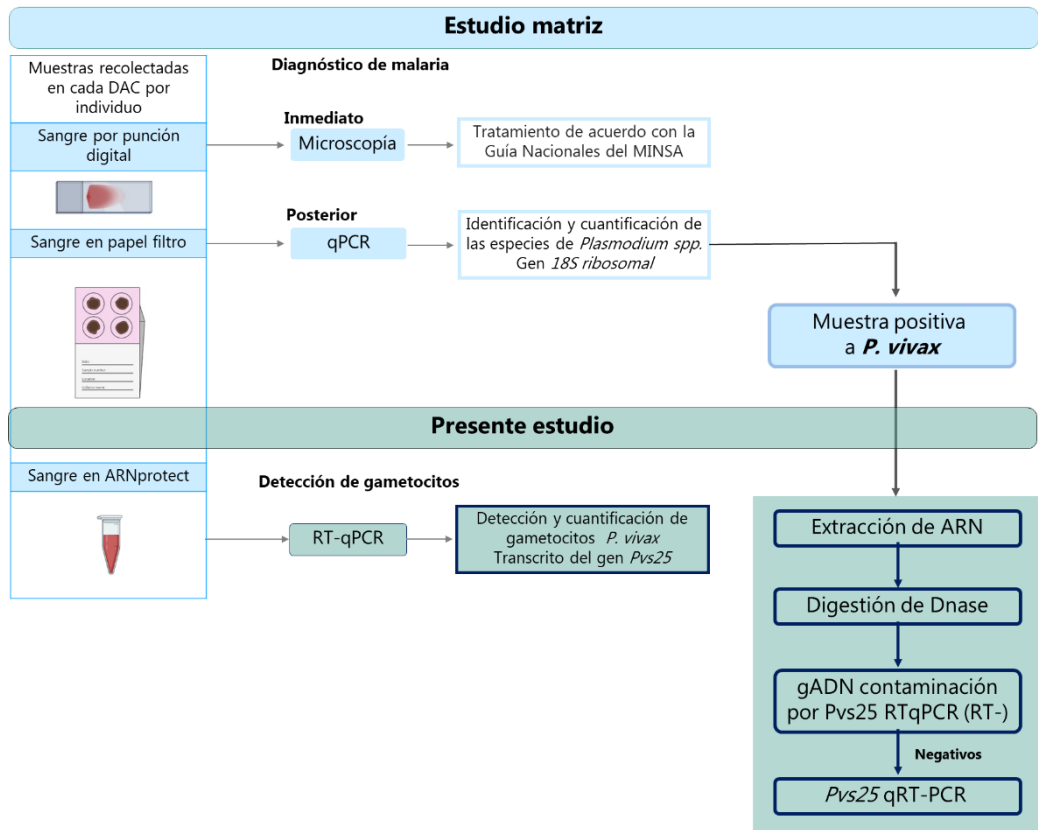
*Figura 3. Diseño del estudio matriz y presente estudio.*

## 5.2 Diseño experimental

En los 4 barridos de DAC consecutivos, con intervalos de 10 días, ejecutadas por el estudio matriz se visitó a todos los habitantes en su domicilio, se realizó diagnóstico inmediato por microscopía a partir de punción digital, y solo a los positivos se les dio tratamiento, independiente de la presencia de síntomas, de acuerdo a las normas nacionales del MINSA (Ministerio de Salud del Perú)<sup>45</sup>. También, tomaron muestras de sangre adicionales: en papel filtro para su procesamiento posterior por qPCR para la identificación de parásitos no

detectados por microscopía y en RNAProtect para la identificación de gametocitos por RT- qPCR.

Los resultados de diagnóstico por microscopía y qPCR de los 4 barridos de DAC del estudio matriz permitió identificar muestras de sangre positivas a *P. vivax* para la detección y cuantificación de gametocitos femeninos maduros a partir de muestras de sangre en ARNprotect en el presente estudio. En la Figura 4 se muestra el esquema de los experimentos realizados en el estudio matriz y el presente estudio.



**Figura 4. Flujograma del diseño experimental del estudio matriz y el presente estudio.**

El estudio matriz fue ejecutado previamente, los resultados de diagnóstico y muestra de sangre colectada en RNAProtect fueron tomados para cumplir los objetivos del presente estudio.

### 5.3 Lugar de estudio

El estudio matriz se llevó a cabo en 4 comunidades del distrito de Mazán (Norte de Iquitos), provincia Maynas, Departamento de Loreto, en la Región Amazónica peruana.

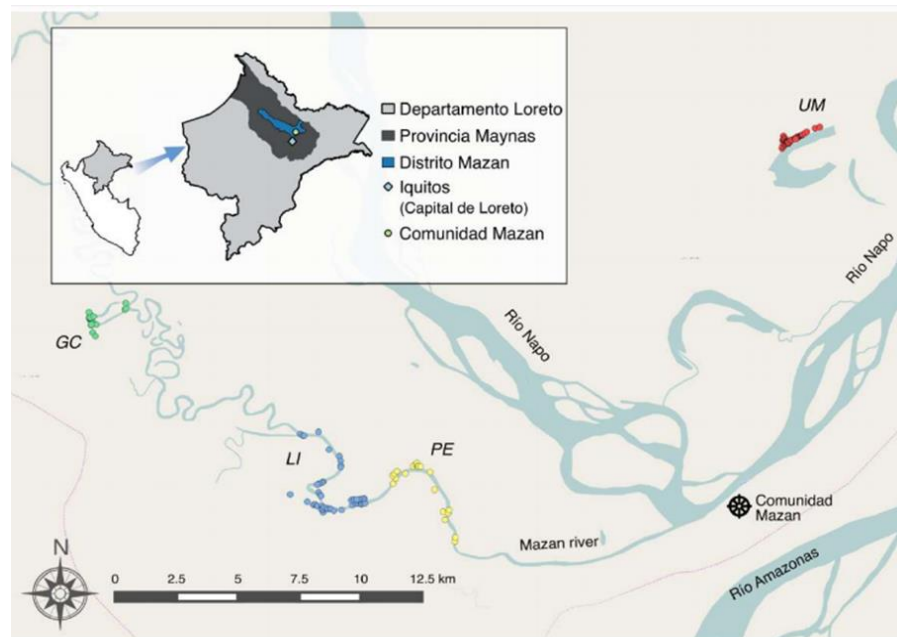
Las comunidades del estudio en mención fueron: Gamitanacocha (GC - 3.426° S, 73.318° W), Libertad (LI - 3.496° S, 73.234° W), Primero de Enero (PE - 3.494° S, 73.221° W) y Urco Miraño (UM -

3.361° S, 73.064° W). Todas habían reportado un incremento inusual de casos determinado por la Dirección regional de Salud Loreto (DRSL), Figura 5.

Mazán es uno de los distritos de Loreto con el índice parasitario anual (API) más alto: 96 casos por cada 1000 habitantes en el 2017<sup>46</sup>, compuesto de pequeñas comunidades y su capital. La comunidad más grande es la comunidad de Mazán (3.503° S, 73.094° W), localizada cerca de la confluencia de los ríos Mazán y Napo, a unos 55 km – 60 km de la ciudad de Iquitos (1 hora en lancha rápida). Las personas de las comunidades ribereñas de este distrito viven principalmente en casas de madera abierta o semi-abiertas sin divisiones. La principal actividad económica es la agricultura, seguida de la tala estacional; actividades que exponen a los individuos a las picaduras de mosquitos<sup>47</sup>.

La malaria en Mazán es perenne con una marcada estacionalidad y un pico de casos después de las temporadas de lluvias (mayo - setiembre) y se transmite principalmente por la picadura del mosquito *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi*<sup>48</sup>. Existe un predominio de casos de *P. vivax* (74%) sobre los de *P. falciparum* (26%)<sup>46</sup>. Todos los grupos de edad tienen riesgo de infección, aunque los adultos más que los niños<sup>47</sup>. Cuenta con un Centro de Salud ubicado en la comunidad de Mazán que brinda diagnóstico de malaria mediante microscopía óptica y tratamiento completo en infecciones de malaria confirmadas. El diagnóstico y el tratamiento de la malaria en el área siguen los procedimientos y pautas según las guías del Ministerio de Salud<sup>45</sup>. El diagnóstico se basa en la

detección pasiva de casos (DPC) y en el diagnóstico por microscopía realizado en los puestos de Salud. Las intervenciones de DAC por microscopía se realizan únicamente cuando se notifican brotes inusuales del número de casos en una comunidad. Se administra cloroquina (CQ) durante 3 días (10 mg / kg los días 1 y 2, y 5 mg / kg el día 3) más primaquina (PQ) durante 7 días (0,5 mg / kg / día) en individuos con *P. vivax*, mientras que mefloquina (MQ) durante 2 días (12,5 mg / kg / día) más artesunato (AS) durante 3 días (4 mg / kg / día) en infecciones confirmadas por *P. falciparum*. Se ha confirmado la eficacia de CQ para *P. vivax* y de la combinación MQ-AS para *P. falciparum* en la Amazonía peruana<sup>45</sup>.

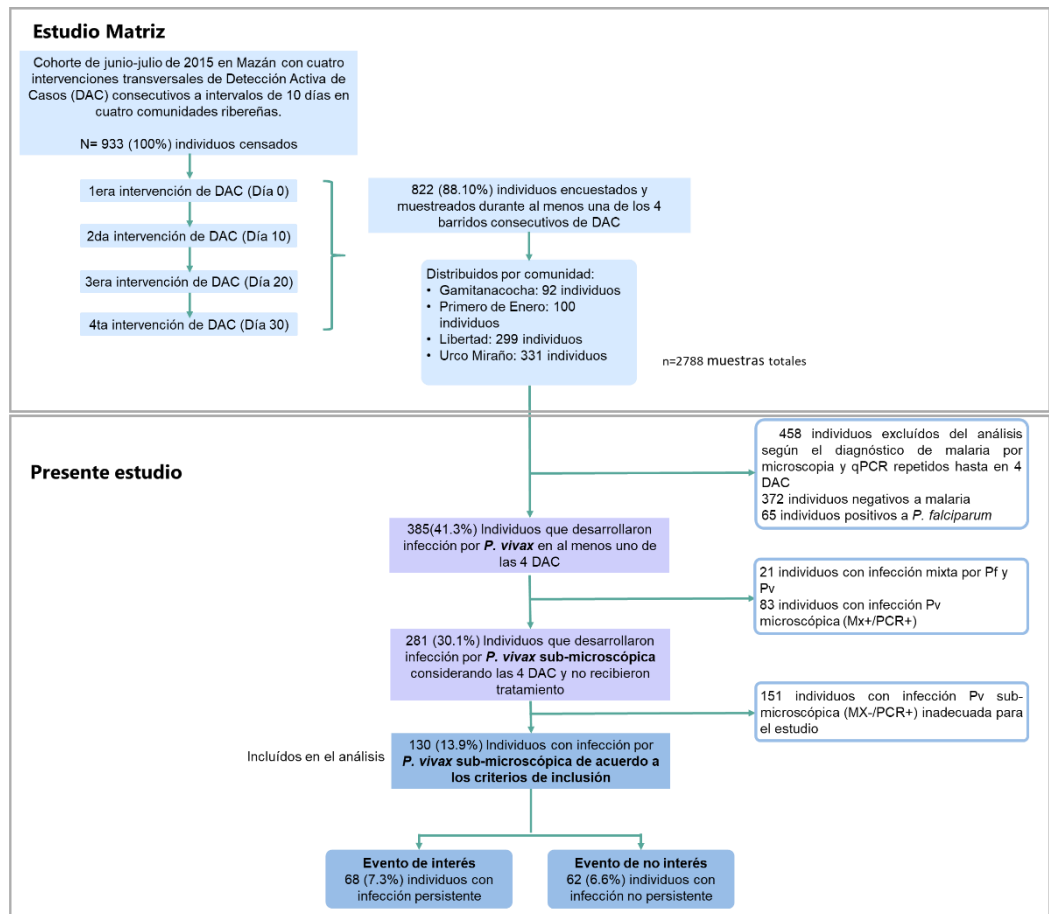


**Figura 5. Ubicación espacial de las comunidades de Gamitanacocha (GC, círculos verdes), Libertad (LI, círculos azules), Primero de Enero (PE, círculos amarillos) y Urco Miraño (UM, círculos rojos) en el distrito de Mazán, Departamento de Loreto, Amazonía peruana.**

#### 5.4 Población del estudio matriz y muestra del presente estudio

De 933 individuos censados por el estudio matriz, 822 (88.10%) fueron individuos encuestados y muestreados durante al menos una de los 4 barridos consecutivos de DAC. Se recogieron 2788 muestras durante el seguimiento de todos los individuos encontrados en las cuatro comunidades del distrito de Mazán, con registros de datos clínicos completos disponibles para todas las muestras. El estudio matriz reportó 588 muestras con resultado positivo a *P. vivax* por qPCR, correspondientes a 385 individuos y 83 muestras positivo a *P. vivax* por microscopía, correspondientes a 83 individuos, las cuales fueron procesadas para la detección y cuantificación de gametocitos femeninos maduros por RT-qPCR en el presente estudio.

Se encontraron 281 individuos que habían desarrollado una infección submicroscópica por *P. vivax* hasta en 4 barridos de DAC. Se excluyeron a 151 individuos según los criterios del estudio (**Anexo 1**). Con estas consideraciones, se identificaron 62 (6.6%) individuos con infección submicroscópica no persistente por *P. vivax* (evento de no interés) y 68 (7.3%) individuos con infección submicroscópica persistente por *P. vivax* (evento de interés), todos aptos para evaluar presencia de gametocitos. En la Figura 6 se muestra la distribución de los individuos de la población del estudio matriz e individuos incluidos en el presente estudio de acuerdo con el curso de la infección submicroscópica por *P. vivax*, persistente y no persistente.



**Figura 6. Flujograma de la distribución de la población del estudio matriz y muestra del presente estudio.**

## **5.5 Consideraciones éticas**

El presente estudio cuenta con la aprobación del Comité Institucional de Ética para Humanos de la UPCH (código SIDISI: 202060) para acceder a las muestras de sangre y base de datos del estudio matriz (código SIDISI: 64371). Todos los participantes del estudio matriz firmaron el consentimiento informado y en caso de menores de edad, la firma de consentimiento estuvo a cargo de los padres o tutores. Los métodos de diagnóstico se llevaron a cabo según la guía del MINSA<sup>45</sup>. Los individuos con diagnóstico positivo a malaria por microscopía recibieron tratamiento inmediato. Mientras que individuos con microscopía negativa y PCR positivo no obtuvieron tratamiento debido a que el diagnóstico por PCR de las muestras de sangre en papel filtro se realizó aproximadamente 9 meses después de la recolección de la muestra. Para el presente estudio se seleccionó y analizó un subgrupo de datos del estudio matriz.

## **5.6 Data sociodemográfica**

Los individuos asintomáticos se definieron como aquellos con infección confirmada que no presentaban ninguno de los siguientes síntomas: fiebre, escalofríos y/o dolor de cabeza en el momento de la visita o en los últimos 7 días.

Los individuos con infección submicroscópica por *P. vivax* fueron agrupados según la distancia entre comunidades: contiguas [Libertad (LI) y Primero de Enero (PE)], y alejadas [Gamitanacocha (GC) y Urco Mirañó (UM)].

Además, se clasificaron en dos grupos etarios: de 5 a 14 años y mayores a 15 años. El punto de corte fue 15 años de edad por ser la edad en la que los habitantes de la región amazónica empiezan a trabajar en actividades como la agricultura, pesca o maderería; ocupaciones que exponen a los individuos a la infección por *Plasmodium* en la región<sup>47</sup>. También se incluyeron los datos de ocupación (agricultores u otros) y episodio de malaria en el último año de los individuos seleccionados para el presente estudio.

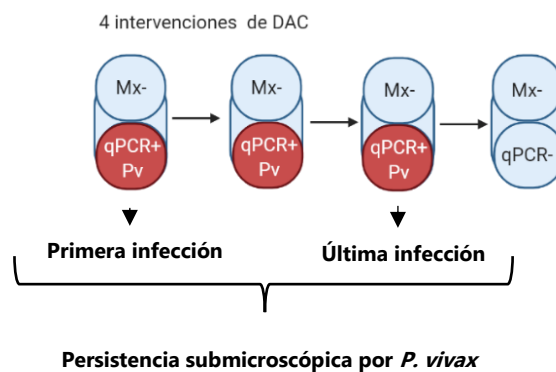
### **5.7 Análisis de resultados**

Se usaron las siguientes definiciones para clasificar a los individuos con infección submicroscópica por *P. vivax* persistente y no persistente según el curso de la infección durante el seguimiento en una ventana de tiempo de 30 días, periodo de observación capturado por el diseño del estudio matriz que contó con 4 barridos de DAC con intervalo de 10 días.

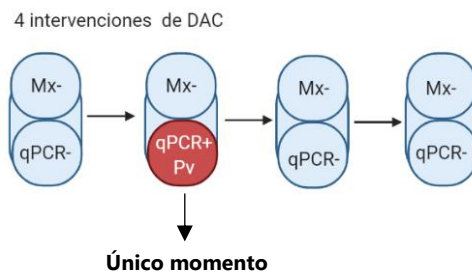
*Infección submicroscópica por P. vivax:* infección por *P. vivax* (Pv) detectada por qPCR, pero con resultado negativo a microscopía (Mx-/qPCR+).

*Evento de interés:* individuo con infección submicroscópica por *P. vivax* persistente durante el seguimiento. El episodio de persistencia abarcó desde el primer y último momento positivo a *P. vivax* disponible. Si en el episodio se presentó un valor negativo después del primer momento positivo a *P. vivax* y luego vuelve a ser positivo en un siguiente momento, este aún fue considerado como

positivo persistente desde el punto inicial (es decir: positivo, negativo, positivo, negativo; registrado como 20 días). La primera y última infección disponible indican el primer y último momento que fue detectada la infección en un tiempo de observación de 30 días. El episodio persistente no posee inicio y final confirmado de infección en este estudio.



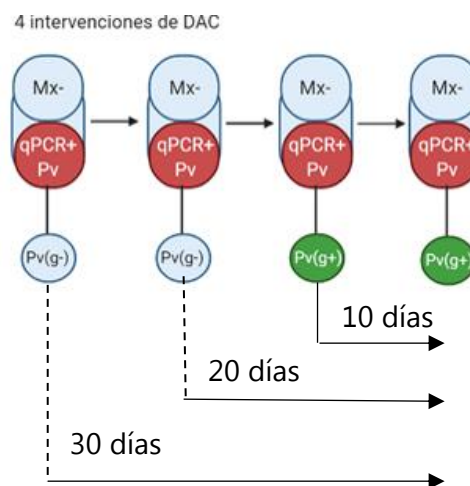
Evento de no interés: individuo con infección submicroscópica no persistente por *P. vivax*. El episodio no persistente se conformó por un único momento positivo a *P. vivax*, obligatoriamente entre encuestas transversales con diagnósticos negativos a *P. vivax*, el episodio no persistente posee inicio y final confirmado de infección.



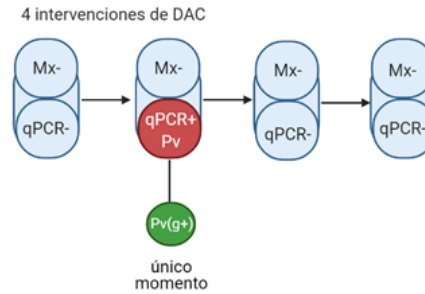
Debido a que se desconoce el inicio y/o el final de la infección persistente submicroscópica, la presencia de gametocitos no se puede describir desde el inicio de la infección. Se aprovecha la ocurrencia dinámica de gametocitos en el curso de una infección para definir la presencia o ausencia de gametocitos en los eventos de interés (episodios persistentes) usando de referencia el tiempo transcurrido hasta la última infección disponible del episodio. Las definiciones y criterios se describen en detalle en el **Anexo 2**:

### Presencia de gametocitos

En eventos de interés: cuando se obtiene resultado positivo para gametocito (g+) al menos 10 días previos a la última infección disponible del episodio persistente.

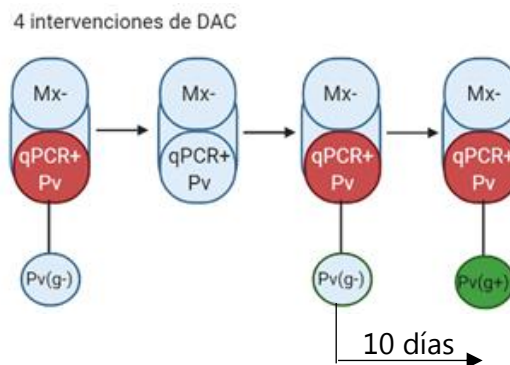


En eventos de no interés: cuando el único momento de la infección no persistente posee resultado positivo a gametocitos (g+).

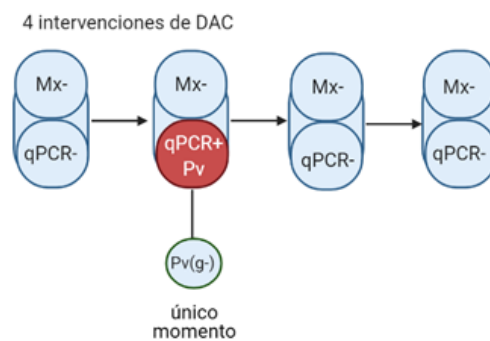


**Ausencia de gametocitos**

En eventos de interés: cuando se obtiene resultado negativo para gametocito (g-) al menos 10 días previos al último momento de infección disponible del episodio persistente.



En eventos de no interés: cuando el único punto del episodio no persistente posee resultado negativo a gametocitos (g-).



## **5.8 Detección y cuantificación de gametocitos en infecciones *por P. vivax***

### **5.8.1 Extracción de ARN usando Qiagen's RNeasy Mini Kit**

El ARN se purificó a partir de muestras de sangre (sangre entera) colectados en RNAprotect Cell Reagent® (Quiagen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se descongelaron las muestras de sangre en RNAprotect a temperatura ambiente, se centrifugó el tubo a 14000 g durante 20 minutos a 20-25°C. Se descartó el sobrenadante sin alterar el sedimento celular, y si no se observó ningún sedimento después de la centrifugación, se retiró el sobrenadante y se dejó 30-40 uL de RNAprotect en el tubo. Se añadió 600 uL de Buffer RLT (proporcionado por el kit) y se agitó durante 15-20 segundos para disolver el pellet. Se incubaron los tubos durante 10 minutos en un Thermoshaker a 1400 rpm (temperatura ambiente) para permitir una mayor homogenización. Se añadió 600 µL de etanol 70% al lisado de células y se mezcló por pipeteo. Se transfirió 600 µL del lisado a la columna de purificación, insertada en un tubo colector (Paso 1). Se centrifugó la columna por 15 segundos a velocidad mayor o igual a 8000 g (Paso 2). Se descartó el líquido filtrado y se colocó la columna nuevamente en el tubo colector (Paso 3). Se repitieron los pasos 1, 2 y 3 hasta que todo el lisado haya sido transferido a la columna y centrifugado. Se descartó el tubo colector que contenía el filtrado de la última centrifugación. Se posicionó la columna en un nuevo tubo colector. Se añadió 700 µL de buffer RW1 (incluido en el kit) a la columna de purificación. Se centrifugó por 15 segundos a velocidad

mayor o igual a 8000 g. Se descartó el filtrado y se reusó el tubo colector. Luego, se añadió 500 µL de buffer RPE (proporcionado por el kit, después de la adición de etanol) a la columna de purificación. Se centrifugó por 15 segundos a velocidad mayor o igual a 8000 g. Se descartó el filtrado y se reusó el tubo colector. Nuevamente, se añadió 500 µL de buffer RPE (incluido en el kit) a la columna de purificación y se centrifugó por 2 minutos a velocidad mayor o igual a 8000 g. Para evitar la presencia de residuos de la solución en la columna, se descartó el filtrado y se centrifugó a máxima velocidad (> 11000 g) por un minuto. Se descartó el filtrado y se colocó la columna en un nuevo tubo libre de ARNsas de 1,5 mL (incluido en el Kit). Se añadió 25 uL de agua libre de nucleasas al centro de la membrana de la columna. Se centrifugó por 1 minuto a velocidad mayor o igual a 8000 g para eluir el ARN. Este último paso se repitió reusando el eluido para obtener una alta concentración de ARN. Se descartó la columna de purificación. El ARN se conservó a -80°C hasta su uso.

### **5.8.2 Tratamiento del ARN con ADNasa**

La enzima ADNasa se usó para eliminar el DNA genómico contaminante de las muestras de ARN. El Kit TURBO DNA-free (Thermo Fisher Scientific) que se usó contiene 3 reactivos: la enzima ADNsa, el buffer 10X y el reactivo de inactivación. Se prepararon reacciones de 5 µL en tubos de PCR libres de ARNsas para 25 µL de ARN, siguiendo las especificaciones del fabricante (**Anexo 3**).

Se añadió 2.5 µL de Master Mix a 25 µL de ARN. Se incubó durante 30 minutos a 37°C. Se repitió el último paso con otros 2.5 µL de Master Mix. Una vez terminado el tiempo, se añadió 3 µL del reactivo de inactivación para terminar la reacción y se mezcló bien. Se colocaron nuevamente los tubos en el termociclador a 65 °C por 5 minutos para inactivar la ADNsa.

### **5.8.3 PCR cuantitativo en tiempo real de transcripción inversa (RT-qPCR)**

Para estimar la densidad de gametocitos femeninos maduros en la sangre periférica de pacientes infectados con *P. vivax*, se usó el instrumento LightCycler 480 (Roche) y el protocolo de “LightCycler Multiplex RNA virus Master” (Roche) que realiza la transcripción reversa y PCR en una sola reacción, el cual detectó la expresión de dos genes: el gen codificante *pfs25* para el gametocito *P. falciparum* y el gen codificante *pvs25* para el gametocito *P. vivax*, acorde a lo reportado por Wampfler *et al.* El diagnóstico para ambas especies de *Plasmodium* confirmó que no hay infecciones mixtas en las muestras seleccionadas.

Con el fin de cuantificar la cantidad absoluta de transcritos *pvs25* y *pfs25*, se preparó una curva estándar para cada gen a amplificar. La curva estándar cubrió el rango de 10 copias a 1 millón de copias por reacción, para ambos casos. Se usó la construcción del estándar *pvs25* y *pfs25*. El ADN codificante (cADN) de *P. vivax* y *P. falciparum* fue amplificado usando los *primers* descritos por Wampfler *et al.* (**Anexo 4**).

Para obtener los 6 puntos de cada curva, se tomaron alícuotas de 10 µL de los estándares de ADN correspondientes a *pvs25* y *pfs25* y se diluyó en 90 µl de agua grado molecular. Este correspondió al primer punto de la curva (1 millón de copias). A partir de esto, se realizaron diluciones seriadas con un factor de dilución de 10 para obtener los 5 puntos restantes de la curva.

Para la reacción se usaron las recetas de MasterMix para RT+ (transcripción reversa positiva) y RT- (transcripción reversa negativa) detalladas en el **Anexo 5**, y 5 µL de ARN. Las condiciones de ciclado de la reacción RT-qPCR fueron aquellas detalladas en el manual del fabricante (**Anexo 6**).

Se colocó una nueva placa de PCR cuantitativa en un cooler y se transfirió 15 µL del Master Mix a cada pozo. Previamente, se dejó descongelar las muestras de ARN en hielo. Luego, se añadió 5 µL de ARN de muestra por duplicado, controles positivos (muestras positivas a *P. vivax* con presencia de gametocitos por microscopía), controles sin RT para detectar la presencia de ADN genómico, y diluciones de la curva estándar en los pozos respectivos. Para el blanco, se añadió 5 µL de H<sub>2</sub>O.

Una vez que la placa se completó, se cubrió la placa de PCR cuantitativa con un film adhesivo y se centrifugó por 2 minutos a 2000 rpm, esto aseguró que el contenido de los pozos estuviera al fondo.

La fluorescencia emitida fue detectada y cuantificada por el equipo LightCycler 480 (Roche). Esta señal de fluorescencia se produce por la liberación del fluoróforo de la sonda Taqman durante la actividad 5' exonucleasa del ADN polimerasa. Por lo tanto, la fluorescencia detectada por el termociclador de la PCR cuantitativa es directamente proporcional a la del fluoróforo liberado y la cantidad de ADN presente en la PCR.

## **5.9 Plan de análisis**

Los resultados obtenidos por RT-qPCR de detección y cuantificación de gametocitos fueron analizados en el software LightCycler480 v1.5 (Roche ®). Luego, se ingresaron en una base datos construida en Excel 2016 (Microsoft ®) y se procesaron en el software STATA V.15 (StataCorp., TX, USA), R v.3.6.1 (R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) y el software Prism (Graphpad® San Diego, CA).

Se determinó la presencia de gametocitos en 588 muestras positivas a *P. vivax* de los 4 barridos de DAC (estimación de la prevalencia de gametocitos) independientemente de los síntomas o tratamiento previo.

La prevalencia se definió como el número de individuos con la infección respecto a la población total, mientras que el término proporción se utilizó para definir la proporción de individuos asintomáticos/submicroscópicos/gametocitémicos respecto al número

total de infecciones. Dado que sólo se procesaron muestras positivas a *P. vivax* para la detección de gametocitos basada en el ARN, la prevalencia de la población de gametocitos se considera una estimación. Todas las infecciones por *P. falciparum* fueron excluidas del análisis.

Se agruparon a los individuos con infección submicroscópica persistente e infección submicroscópica no persistente por *P. vivax* de acuerdo con el curso de la infección durante el seguimiento (**Anexo 1**). Luego, se describió la proporción de gametocitos femeninos maduros en cada grupo de infección de acuerdo con los criterios del presente estudio (**Anexo 2**).

Se utilizaron las pruebas estadísticas no paramétricas U Mann-Whitney para comparar la mediana de la densidad de gametocitos en persistentes (al menos 10 días, solo 10 días, 20 días o 30 días) y no persistentes y Wilcoxon signed-rank para comparar la mediana de la densidad de gametocitos entre el momento previo (al menos 10 días, solo 10 días, 20 días o 30 días) y el último momento de infección disponible en individuos con infección submicroscópica persistente. En todos los análisis las diferencias con valores  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativas.

Para determinar la relación entre infecciones submicroscópicas por *P. vivax* persistentes y la presencia de gametocitos, se evaluó mediante un análisis univariado y multivariado el tipo de infección submicroscópica por *P. vivax* (persistente y no persistente) con la

presencia de gametocitos (variable categórica dicotómica), la densidad de gametocitos (variable cuantitativa) y las características sociodemográficas empleando el modelo de regresión logística binaria para calcular el OR con un intervalo de confianza al 95% (IC 95%), se consideró como estadísticamente significativo cuando  $p < 0,05$ .

Las siguientes características sociodemográficas fueron usadas como factores de riesgo: comunidad, sexo, edad, ocupación y episodio de malaria en el último año. Se evaluó como efectos fijos en el modelo final: comunidad, sexo, edad, ocupación, episodio de malaria en el último año, presencia de gametocitos, densidad de gametocitos y densidad de parásitos totales.

## VI Resultados

El presente estudio dividió sus resultados en dos fases. La primera fase, buscó comprender la epidemiología de los gametocitos en relación con todas las infecciones por *P. vivax* de cuatro comunidades del distrito de Mazán, Loreto, mediante el monitoreo molecular por RT-qPCR, específico de la etapa de gametocito femenino maduro. Mientras que, en la segunda fase, se exploró las infecciones submicroscópicas persistentes por *P. vivax* tomando en cuenta los cuatro barridos consecutivos de detección activa de casos (DAC) con intervalos de 10 días. En esta última sección se determinó la prevalencia de infecciones submicroscópicas persistentes por *P. vivax* y se evaluó la presencia de gametocitos como factor pronóstico asociado a la persistencia de infección en individuos con infección de al menos 10 días de duración submicroscópica por *P. vivax*.

### **6.1 Fase I: Descripción del reservorio de gametocitos en cuatro comunidades de la Amazonía peruana.**

#### **6.1.1 Prevalencia de infección y gametocitos de *P. vivax* en 4 comunidades del distrito de Mazán**

En total, 2788 muestras de sangre fueron analizadas para la detección de *Plasmodium spp.* mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) y 2788 láminas fueron examinadas por microscopía por el estudio matriz. Obteniendo 588 muestras positivas a *P. vivax* (21.1%; [rango entre barridos 17.2-21.8%]) por qPCR y 83 (3%, [rango entre barridos 1.8-3.1%]) positivas para *P. vivax* por microscopía, las cuales fueron examinadas en el

presente estudio para la identificación de gametocitos por PCR de transcripción reversa (RT-qPCR). Dieciséis muestras de sangre positivas a *P. vivax* por qPCR no estuvieron disponibles para RT-qPCR.

De 572 muestras positivas a *P. vivax* por qPCR, 42.5% (243/572 [rango entre barridos 31.6-58.8%]) fueron positivas a gametocitos por RT-qPCR en las infecciones por *P. vivax*. En contraste, al 48.2% (40/83, [rango entre barridos 6.3-61.1%]) positivas a gametocitos de las infecciones por *P. vivax* detectadas por microscopía.

En los 822 individuos que fueron evaluados por qPCR y microscopía por el estudio matriz, la prevalencia de *P. vivax* total acumulada, es decir, la proporción de individuos con al menos una infección por *P. vivax* en todas las comunidades y barridos, fue 46.8% (385/822) por qPCR y 10.1% (83/822) por microscopía en la población. Además, se reportó que 21/385 individuos tuvieron *P. vivax* y *P. falciparum* en diferentes momentos del seguimiento y 139/385 individuos fueron positivos en más de un barrido a *P. vivax*.

En este estudio solo se evaluaron las infecciones por *P. vivax*, sin tener en cuenta las coinfecciones e infecciones por *P. falciparum*. Los gametocitos fueron detectados por RT-qPCR en 23%

(185/806) del total de individuos. Mientras que, por microscopía, solo 4.9% (40/822) de los individuos tuvieron gametocito por *P. vivax*.

En cada comunidad se reportó la media de la prevalencia de *P. vivax* por qPCR. Este estudio halló la media de la prevalencia y proporción de gametocitos mediante RT-qPCR dirigida al transcrito del gen *Pvs25* entre las muestras positivas a *P. vivax* de cuatro barridos de DAC. Los barridos se realizaron con intervalos consecutivos de 10 días dentro de una cohorte durante Junio -Julio del 2015.

La prevalencia de infecciones por *P. vivax* por qPCR fue significativamente mayor en Libertad (media 23.9%, [Rango entre barridos 20.6-27.7%]) que en Gamitanacocha (media 14.7%, [rango entre barridos 9.5-20.3%],  $P=0.04$ ) y en Primero de Enero (media 17.8%, [rango entre barridos 14.9-19.7%],  $P=0.02$ ). No hubo variación significativa respecto a Urco Mirañó (media 21%, [rango entre barridos 18.5-24.8%],  $P=0.24$ ), Figura 7.A.

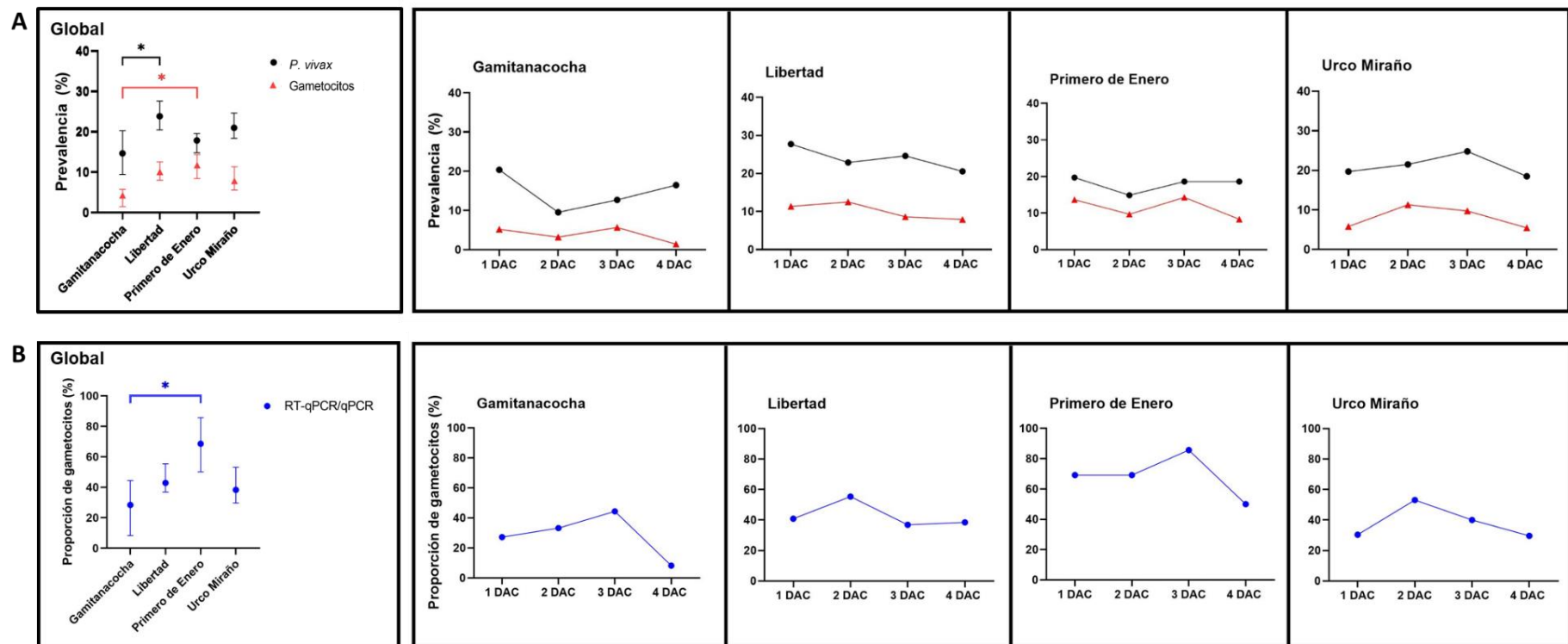
La prevalencia de gametocitos por RT-qPCR difirió significativamente según comunidad. En Primero de Enero (media 11.5%, [rango entre barridos 8.3-14.3%]) la prevalencia de gametocitos fue mayor que en Gamitanacocha (media 3.8%, [rango entre barridos 1.4-5.6%],  $P=0.02$ ). No hubo variación

significativa con Libertad (media 10.1%, [rango entre barridos 7.9-12.4%]) ni con Urco Miraño (media 8.05%, [rango entre barridos 5.4-11.3%]), Figura 7A.

La proporción de gametocitos en las infecciones alcanzaron su punto máximo en Primero de Enero (media de la proporción de gametocitos 68.54%, rango entre barridos 50-85.7%) y disminuyó significativamente en Gamitanacocha (media 28.3%, rango entre barridos 8.3-44.4%,  $p=0.03$ ). Libertad (media 42.9%, rango entre barridos 36.8-55.3%) y Urco Miraño (media 38.3%, rango entre barridos 29.6-53.1%) no mostraron variación significativa entre las comunidades, Figura 7.A y B.

En conjunto, los datos indican que la prevalencia y proporción del reservorio de gametocitos entre comunidades del mismo distrito, y comunidades ubicadas en la misma micro-cuenca (Gamitanacocha, Libertad y Primero de Enero) en temporada de alta transmisión (Junio -Julio del 2015) varían.

La baja prevalencia de infección por *P. vivax* en Gamitanacocha con respecto a las demás comunidades, también se vio reflejada en una disminución significativa de la prevalencia y proporción de gametocitos comparada a Primero de Enero.



**Figura 7. Infecciones y gametocitos por *P. vivax* en cuatro comunidades del distrito de Mazán, Loreto; en una cohorte de cuatro barrios de Junio-Julio del 2015.**

A) Se muestra la prevalencia de *P. vivax* por qPCR en círculos negros (que incluye a los estadios asexuales como los sexuales) y la prevalencia de gametocitos por RT-qPCR en triángulos rojos. B) Proporción de gametocitos maduros femeninos en infecciones por *P. vivax* en círculos azules. Los símbolos en las gráficas globales corresponden a la media de los cuatro barrios y las barras indican el intervalo de confianza al 95% en cada comunidad.

No se encontró diferencias significativas en la parasitemia (todos los estadios) ni en la densidad de gametocitos entre comunidades. La mediana de la parasitemia de *P. vivax* entre comunidades fue 37.2 copias de 18S/ $\mu$ l (RIQ: 82.4). La mediana de la densidad de *P. vivax* fue más alta en Urco Miraño (85.8 copias/ $\mu$ l, RIQ: 91.7) que en Gamitanacocha (0.8 copias/ $\mu$ l, RIQ: 69.6), Libertad (41.9 copias/ $\mu$ l, RIQ:60.3) y Primero de Enero (19.8 copias/ $\mu$ l, RIQ:35.7), no se encontró diferencia entre comunidades ( $p=0.22$ ).

La mediana de la densidad de gametocitos de *P. vivax* por RT-qPCR entre comunidades fue 29.8 gametocitos/uL (RIQ:113.1). La mediana más alta de gametocitos fue en Urco Miraño con 90.5 gametocitos/ $\mu$ l (RIQ: 350.4) y la más baja en Gamitanacocha 2.4 gametocitos/ $\mu$ l (RIQ: 351.2), seguido de Primero de Enero 24.15 gametocitos/ $\mu$ l (RIQ: 31.6) y Libertad, 70.30 gametocitos/ $\mu$ l (RIQ: 421.2), ( $p=0.3$ ).

### **6.1.2 Proporción de gametocitos en infecciones por *P. vivax* estratificadas por rangos de edades**

Según rango de edad en las cuatro comunidades, la prevalencia de infecciones por *P. vivax* y de gametocitos aumentan con la edad hasta los 15-39 años de edad (media 22.7, rango entre barridos [10-31.5%]), luego disminuye en mayores a 40 años de edad. Los individuos de menor edad, <5 años de edad

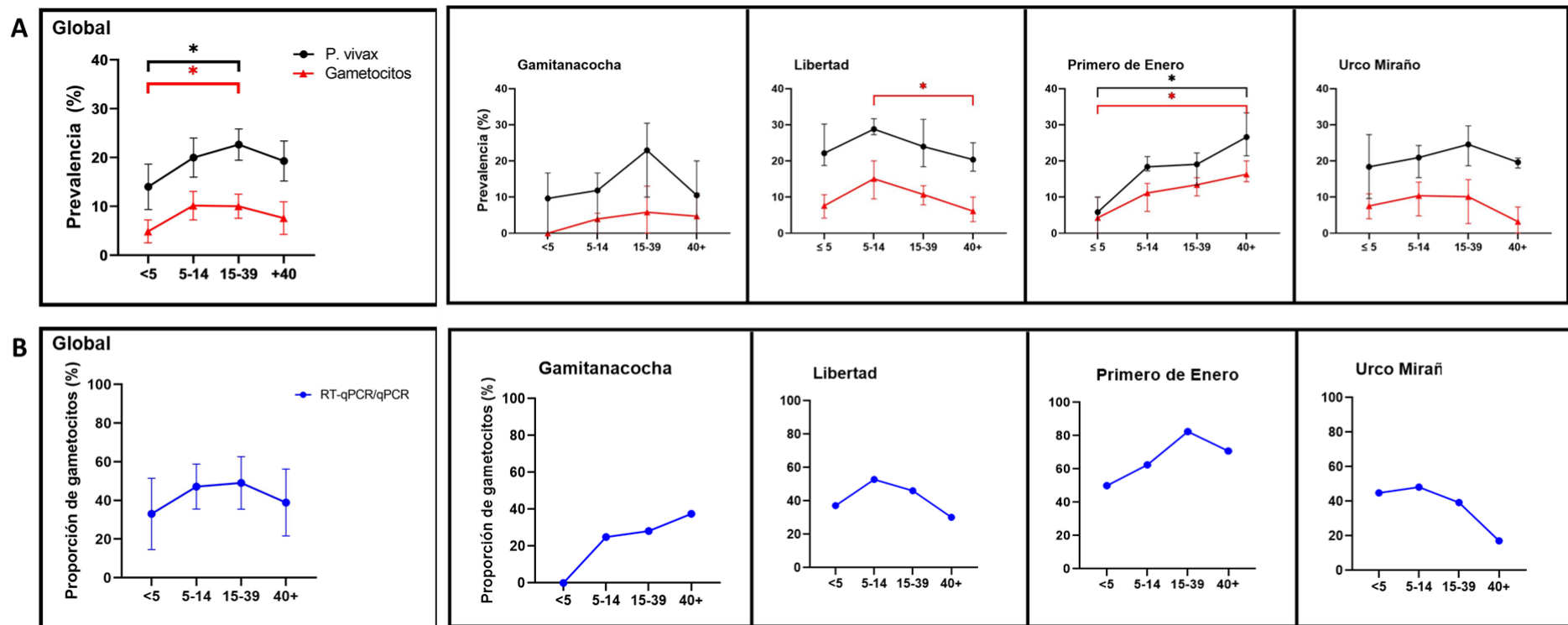
(14%, rango entre barridos [0-30%]) tuvieron una prevalencia más baja que el rango 15-39 años de edad ( $p=0.02$ ). Sin embargo, la proporción de gametocitos no varió significativamente entre las edades, (Figura 8. A y B).

En Gamitanacocha, la proporción de gametocitos en infecciones por *P. vivax* alcanzó su punto máximo en el rango de edad mayores a 40 años (37.5 %, [rango entre barridos 0-38.46%]). En Libertad, comunidad con alta prevalencia de infección por *P. vivax*, la proporción de gametocitos fue mayor en el rango de edad 5-14 años (52.8%, rango entre barridos [33.3-70.6%]). En Primero de Enero, se observó un incremento de la proporción de gametocitos hasta los 15-39 años de edad (82.5 %, rango entre barridos [75-100%]) y en Urco Miraño se mostró un descenso de la proporción de gametocitos a partir de los 5-14 años de edad (48.2%, rango entre barridos [31.3-62.5%]), al igual que Libertad.

No obstante, entre los rangos de las edades de cada comunidad no se observaron diferencias significativas en la proporción de gametocitos. Libertad obtuvo un patrón de prevalencia y proporción de gametocitos según rango de edad similar al patrón de prevalencia de infección.

Los resultados obtenidos sugieren que la portación de gametocitos aumenta con la edad, y de forma significativa entre

<5 años de edad y 15-39 años de edad. Sin embargo, para cada comunidad el rango de edad con mayor prevalencia y proporción de gametocitos varía, y puede ser entre las edades: 5-14 años (Libertad y Urco Miraño), 15-39 años (Primero de Enero) y mayores a 40 años (Gamitanacocha). La menor prevalencia de gametocitos se encontró entre los niños menores de 5 años en Gamitanacocha y Primero de Enero. Mientras que, en Libertad la menor prevalencia de gametocitos se halló en menores a 5 años de edad y mayores a 40 años de edad. En Urco Miraño la menor prevalencia de gametocitos se encontró en los mayores a 40 años de edad.

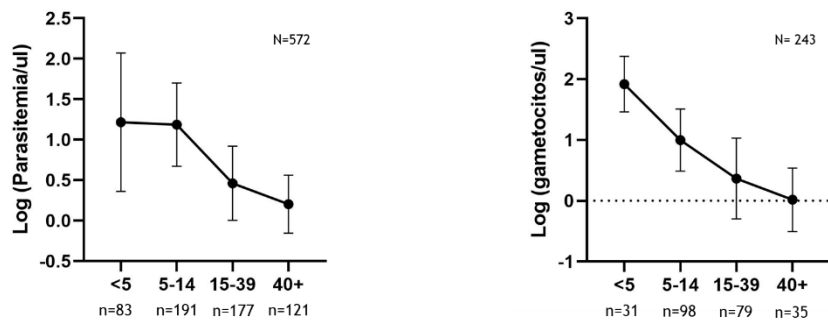


**Figura 8. Infecciones y gametocitos por *P. vivax* estratificadas por edad en cuatro comunidades del distrito de Mazán, Loreto; en una cohorte de cuatro barridos de Junio-Julio del 2015.**

A) Se muestra la prevalencia de *P. vivax* por qPCR (que incluye a los estadios asexuales como los sexuales) en círculos negros y la prevalencia de gametocitos por RT-qPCR del transcrito *Pvs25* en triángulo rojo. B) Proporción de gametocitos maduros femeninos de infecciones por *P. vivax* en círculos azules. Los símbolos corresponden a la media de la prevalencia o proporción de los cuatro barridos y las barras indican el intervalo de confianza al 95% durante los barridos.

### 6.1.3 Densidad de las parasitemias y gametocitos por rangos de edades

La parasitemia y gametocitemia mostró diferencias entre los rangos de edad. La parasitemia y gametocitemia fue mayor en niños menores de 5 años, mientras que conforme se incrementó la edad ambas densidades decrecieron, Figura 9. No se observó diferencias significativas entre los rangos de edad. La densidad de gametocitos se evaluó en 243 infecciones por *P. vivax* con gametocitos.



*Figura 9. Comparación de la densidad parasitaria y gametocitaria de las infecciones positivas a P. vivax según rango de edad.*

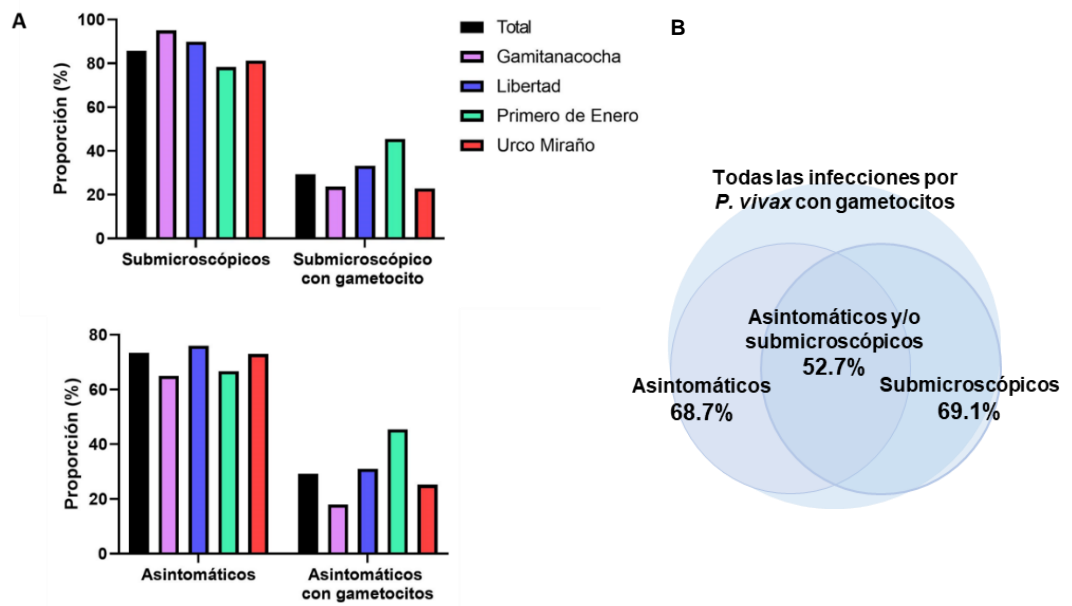
### 6.1.4 Infecciones submicroscópicas y asintomáticas por *P. vivax* con gametocitos

Durante todo el periodo de estudio se encontraron altas proporciones de infecciones submicroscópicas y asintomáticas, Figura 10.A. Las infecciones submicroscópicas representaron el 85.7% (rango entre barridos [85.6-90.4%]) de las infecciones por *P. vivax* detectadas por qPCR y de las infecciones asintomáticas, el

73.3% (rango entre barridos [48.2-83.3%]). No se encontró diferencia significativa en las proporciones submicroscópicas y asintomáticas entre comunidades, Figura 10.A.

Las proporciones de submicroscópicos con gametocitos y asintomáticos con gametocitos entre las infecciones *P. vivax* oscilaron entre 8.33% y el 78.6% entre las comunidades. Primero de Enero fue la comunidad con las más altas proporciones de submicroscópicos con gametocitos y asintomáticos con gametocitos (45.5% [rango entre barridos 14.3-78.6%]) comparado a Gamitanacocha, Libertad y Urco Mirañó; sin embargo, las diferencias entre comunidades no fueron significativas ( $P=0.38$ ), Figura 10.A.

Las infecciones asintomáticas y submicroscópicas constituyen la mitad del total del reservorio de infecciones *P. vivax* con gametocitos, Figura 10.B.



**Figura 10.** Infecciones submicroscópicas y asintomáticas por *P. vivax* con gametocitos por RT-qPCR en cuatro comunidades del distrito de Mazán, Loreto.

A) Proporciones de infecciones submicroscópicas y asintomáticas con gametocitos en las infecciones por *P. vivax* (RT-qPCR/qPCR). B) Diagrama de Venn para la contribución de las infecciones asintomáticas y submicroscópicas al reservorio total de infecciones *P. vivax* con gametocitos (qPCR/RT-qPCR).

## 6.2 Fase II: Exploración de la asociación entre la persistencia submicroscópica y la presencia de gametocitos

### 6.2.1 Descripción de los individuos con infección submicroscópica incluidos en el presente estudio

Para determinar los posibles factores pronóstico asociados a la persistencia submicroscópica por *P. vivax*, se incluyó en este estudio un total de 130 (13.9%) individuos con infección

submicroscópica por *P. vivax* de acuerdo con los criterios de inclusión para el estudio prospectivo de razón de proporciones.

La prevalencia de las infecciones submicroscópicas persistentes por *P. vivax* por qPCR fue 7.3%.

El evento de interés, infección submicroscópica persistente, tuvo mayor representación (n=68, 52.3%) que los individuos con infección no persistente (n=62, 47.7%) entre los individuos incluidos en el estudio, Tabla 1. La mayoría de los participantes pertenecían a comunidades cercanas (51,41%), respecto a comunidades alejadas (48,59%). Ambos sexos tuvieron similar proporción en los participantes (alrededor del 50%). El 63.1% fue mayor de 15 años. El 91.5% no viajaron en el último mes. La ocupación entre individuos fue agricultor en 49.2% y el 75.4% de los individuos informó no experimentar malaria en los últimos 12 meses, Tabla 1.

### **6.2.2 Mayor proporción de gametocitos en individuos con infecciones submicroscópica persistentes que en no persistentes por *P.vivax***

En las infecciones persistentes, se condicionó la presencia de gametocitos al menos 10 días previos a la última infección disponible con la finalidad de explorar la presencia de gametocitos como factor pronóstico de persistencia submicroscópica. Mientras que, en infecciones no persistentes, la presencia de gametocitos se

determinó en su único momento con diagnóstico positivo a *P. vivax*. Se definió al menos 10 días previos a la última infección por el tiempo de observación de las infecciones durante el seguimiento, Anexo 7.

Con estas consideraciones, se logró determinar la presencia o ausencia de gametocitos en 130 individuos. Se reportó que el 32.2% de los participantes presentó gametocitos en sus infecciones submicroscópicas por *P. vivax* no persistentes y el 67.8% de las infecciones submicroscópicas por *P. vivax* persistentes presentó gametocitos, con diferencia estadística significativa ( $p = 0.001$ )

Tabla 1.

*Tabla 1. Características de los individuos con infección submicroscópica persistente y no persistente por P. vivax.*

	Persistente		No persistente		Total		P-value
	n	%	n	%	N	%	
<b>Total</b>	68	52.3	62	47.7	130	100.0	
<b>Agrupación de comunidades</b>							
Cercanas: LI y PE	31	46.3	36	53.7	67	51.5	0.16
Alejadas: GC y UM	37	58.7	26	41.3	63	48.5	
<b>Sexo</b>							
Hombre	33	51.6	31	48.4	64	49.2	0.87
Mujer	35	53.0	31	47.0	66	50.8	
<b>Edad (años)</b>							
<15	25	52.1	23	47.9	48	36.9	0.97
≥15	43	52.4	39	47.6	82	63.1	
<b>Viaje (mes anterior)</b>							
Sí	3	27.3	8	72.7	11	8.5	0.08
No	65	54.6	54	45.4	119	91.5	
<b>Ocupación principal</b>							
Agricultor	34	53.1	30	46.9	64	49.2	0.85
Ninguno	34	51.5	32	48.5	66	50.8	
<b>Episodio de malaria (12 últimos meses)</b>							
Sí	21	65.6	11	34.4	32	24.6	0.08
No	47	48.0	51	52.0	98	75.4	
<b>Presencia de gametocitos</b>							
Sí	40	67.8	19	32.2	59	45.4	0.001
No	28	39.4	43	60.6	71	54.6	

### **6.2.3 No se observó diferencias entre densidad de gametocitos en infecciones submicroscópicas no persistentes en comparación con infecciones persistentes por *P. vivax***

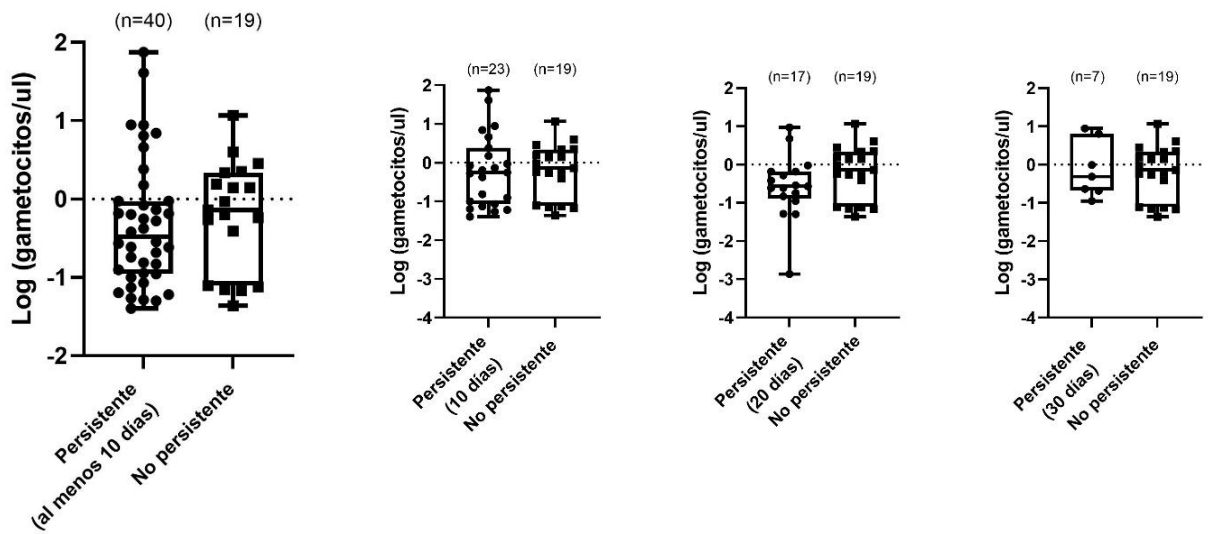
Se determinó si existía una diferencia significativa entre la mediana de la densidad de gametocitos en el momento de al menos 10 días previos a la última infección disponible del episodio submicroscópico persistente versus la densidad de gametocitos en el único momento de la infección submicroscópica no persistentes con la finalidad de conocer si hay un valor de la densidad de gametocitos relacionada a la persistencia. Debido a que la densidad de gametocitos posee valores pequeños, es menos evidente una diferencia entre grupos, por lo que se decidió trabajar con la transformación logarítmica de la densidad de gametocitos para facilitar su gráfica.

Los resultados no indican una diferencia estadística significativa a presentar mayor densidad de gametocitos en las infecciones submicroscópicas persistentes comparado con las infecciones submicroscópicas no persistentes. Tampoco se encontró una diferencia estadísticamente significativa al comparar la densidad de gametocitos en el momento de 10 días, 20 días y 30 días previos a la última infección disponible de los episodios persistentes versus el único momento de las infecciones no persistentes, Figura 11.

La mediana de la densidad de gametocitos, en infecciones submicroscópicas persistentes, fue de 0.33 gametocitos/ $\mu\text{L}$ , (RIQ 0.83); mientras que la mediana de la densidad de gametocitos de las infecciones no persistentes fue 0.72 gametocitos/ $\mu\text{L}$  (RIQ 2.1). La densidad de gametocitos más alta en episodios persistentes fue 74.79 gametocitos/ $\mu\text{L}$  y la más alta en episodios no persistentes fue 11,72 gametocitos/ $\mu\text{L}$ .

El resultado obtenido sugiere que la inversión en gametocitos en infecciones no persistentes es baja respecto a la inversión de gametocitos en infecciones persistentes. Ya que, de las 62 infecciones no persistentes evaluadas, solo 19 desarrollaron gametocitos. Por el contrario, de 68 infecciones persistentes, 46 desarrollaron gametocitos. No obstante, no se observó una diferencia significativa entre los grupos en cuanto a la densidad de los gametocitos. Además, se observa una dispersión amplia de los valores de densidad en las infecciones persistentes. La persistencia submicroscópica podría no depender de la densidad de gametocitos en la infección, sin embargo; su presencia podría servir como indicador de la disponibilidad de parásitos asexuales para la continuidad de la reproducción (estadios sexuales) o supervivencia (restricción reproductiva y replicación asexual) de la infección submicroscópica. La cuantificación de estadios asexuales en las infecciones submicroscópicas proporcionaría información

complementaria sobre el cambio de la inversión en reproducción en el curso de una infección submicroscópica persistente.



**Figura 11. Comparación de la mediana de la densidad de gametocitos en persistentes y no persistentes.**

Cada punto representa un momento de infección positivo a gametocitos. Infecciones submicroscópicas por *P. vivax* persistentes no mostraron diferencia estadística significativa a tener más densidad de gametocitos (al menos 10 días previos a la última infección disponible, solo 10 días previos, 20 días previos o 30 días previos) que aquellas infecciones submicroscópicas por *P. vivax* no persistentes. La línea situada en la parte central de la gráfica es la mediana.  $p = 0.35$ , test de Wilcoxon Mann Whitney.

#### **6.2.4 No se observó una tendencia definida a disminuir la densidad de gametocitos en el curso de los episodios submicroscópicas persistentes por *P. vivax***

Se intentó determinar si hay un aumento o disminución de la densidad de gametocitos dentro de la ventana de tiempo disponible de la infección submicroscópica persistente por *P. vivax*.

Debido a que la ocurrencia de gametocitos es dinámica en los episodios, y en este estudio se desconoce el inicio y/o el final de la infección persistente submicroscópica, se comparó el cambio de la densidad de gametocitos con dos puntos temporales dinámicos en los episodios persistentes: el momento positivo a gametocitos previo a la última infección disponible del episodio persistente (al menos 10 días, solo 10 días, 20 días o 30 días) y la última infección disponible del episodio persistente.

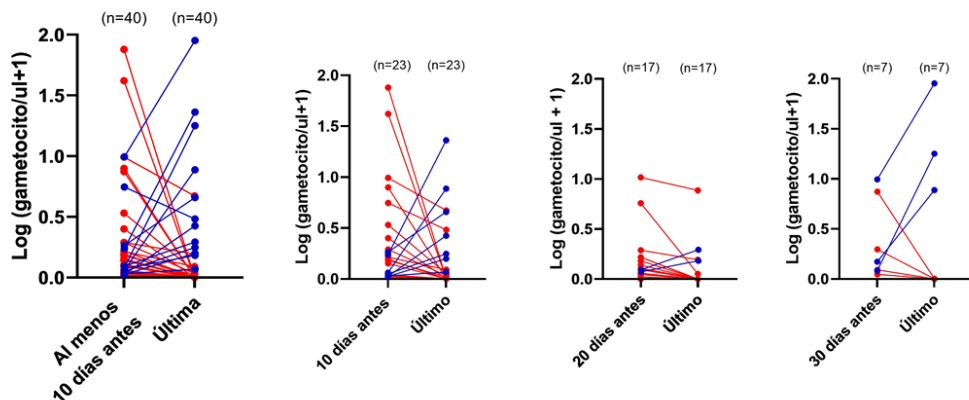
No se evidenció una tendencia a disminuir la densidad de gametocitos, que no fue estadísticamente significativa, en el curso del episodio submicroscópico persistentes por *P. vivax*. Esto tampoco se evidenció en cursos de infección submicroscópica persistente de 10 días, 20 días y 30 días.

La mediana de la densidad de gametocitos al menos 10 días previos a la última infección disponible fue 0.33 gametocitos/ul, mientras que en la última infección disponible fue cero.

Este resultado indica que la densidad de gametocitos durante una infección submicroscópica persistente es fluctuante en el

tiempo. Además, este estudio desconoce a qué momento de la infección persistente corresponde la ventana de la infección disponible en el estudio; inicio, desarrollo o final de la infección.

El número muestral no permitió encontrar diferencias entre los grupos. Las infecciones que mostraron una tendencia de la disminución de la densidad de gametocitos podrían corresponder con un momento de deterioro fisiológico o del ambiente del parásito y optar por la restricción reproductiva (replicación asexual) para favorecer la reproducción futura del parásito (diferenciación a gametocitos). Es necesario conocer la densidad de parásitos asexuales disponibles para evaluar el cambio hacia gametocitos, así como evaluar la fluctuación de la densidad de gametocitos en una infección submicroscópica persistente con inicio y final de infección confirmados por métodos moleculares sensibles.



**Figura 12.** Cambio de la densidad de gametocitos en el curso de la infección submicroscópica persistente por *P.vivax*. Se observó una tendencia de disminución de la densidad de gametocitos entre el momento previo (al menos 10 días, solo 10 días, 20 días o 30 días) y la última infección disponible de la infección submicroscópica persistente, aunque esta tendencia no fue estadísticamente significativa. En rojo, densidad de gametocitos que disminuye y en azul, densidad de gametocitos que aumenta. La línea situada en la parte central de la gráfica es la mediana.  $p= 0.12$ , test de Wilcoxon Mann Whitney pareado.

### **6.2.5 Gametocitos: Factor pronóstico de al menos 10 días más de infección submicroscópica por *P. vivax***

El análisis univariado mostró que la presencia de gametocitos, al menos 10 días previos a la última infección disponible, se asoció significativamente con el riesgo de desarrollar una infección submicroscópica persistente por *P. vivax* después de presentar gametocitos. Ninguna asociación pudo ser encontrada con comunidad, género, edad, ocupación, episodio de malaria en el último año, concentración de gametocitos y concentración de parásitos totales. El análisis multivariado mostró que la presencia de gametocitos permaneció asociada con la persistencia de infección submicroscópica por *P. vivax*.

El resultado sugiere que es 3.23 más probable que ocurra persistencia submicroscópica por *P. vivax* de al menos 10 días más, si hay presencia de gametocitos en una infección en comparación con no presentar gametocitos, dado que el *p-valor* es significativo, ajustado a las variables comunidad, sexo, edad, ocupación principal, episodio de malaria en el último año, concentración de gametocitos y concentración de parásitos totales, **Tabla 2**.

**Tabla 2. Análisis univariado y multivariado para el riesgo de infección submicroscópica persistente por *P. vivax* utilizando regresión logística.**

Factor de riesgo	Infección submicroscópica persistente por <i>P. vivax</i>							
	%	n/N	Univariable			Multivariado		
			OR	[IC 95%]	<i>p-value</i>	OR	[IC 95%]	<i>p-value</i>
<b>Comunidad</b>								
GC y UM	58.73	37/63	Ref					
LI y PE	46.27	31/67	0.61	[0.3-1.2]	0.16	0.55	[0.25-1.2]	0.12
<b>Sexo</b>								
Mujer	53.03	35/66	Ref					
Hombre	51.56	33/64	0.94	[0.5-1.9]	0.86	0.91	[0.43-1.94]	0.82
<b>Edad (años)</b>								
>15	52.44	43/82	Ref					
<15	52.08	25/48	0.98	[0.5-2.01]	0.96	1	[0.31-3.3]	0.99
<b>Ocupación principal</b>								
Ninguno	51.52	34/66	Ref					
Agricultor	53.13	34/64	1.06	[0.5-2.12]	0.85	1.13	[0.36-3.6]	0.84
<b>Episodio de malaria (12 últimos meses)</b>								
No	47.96	47/98	Ref					
Sí	65.63	21/32	2.07	[0.90-4.8]	0.09	2.1	[0.85-5.2]	0.1
<b>Presencia de gametocitos (al menos 10 días)</b>								
No	39.44	28/71	Ref					
Sí	67.80	40/59	3.23	[1.57-6.67]	<b>0.01</b>	3.32	[1.5-7.4]	<b>0.003</b>
<b>Presencia de gametocitos (10-20 días)</b>								
No	42.67	32/75	Ref					
Sí	65.45	36/55	2.54	[ 1.2-5.23]	<b>0.01</b>			
<b>Presencia de gametocitos (30 días)</b>								
No	58.65	61/104	Ref					
Sí	26.92	7/26	0.26	[0.1-0.67]	<b>0.01</b>			

OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza (confidence interval), *p-value*: valor de significancia.

## VII Discusión

Las morbilidades debido a la malaria siguen disminuyendo en el Perú, por esa razón es necesario identificar a los individuos con alta probabilidad de transmitir la malaria para seguir reduciendo la prevalencia de infección. En zonas de baja transmisión de la malaria, los individuos con infección asintomática y submicroscópica persistente podrían contribuir significativamente a la transmisión al adquirir con el tiempo gametocitos transmisibles.

Por ello en el presente estudio se describió el reservorio de gametocitos de cuatro comunidades del distrito de Mazán y se exploró la persistencia submicroscópica.

Los resultados de este estudio proporcionan una cuantificación precisa del reservorio de gametocitos en infecciones por *P. vivax* en el Perú, mediante el uso de herramientas moleculares y una estrategia de intervención de detección activa de casos (DAC). Además, se demuestra la persistencia de las infecciones submicroscópicas en la Amazonía Peruana, y por primera vez, se evalúa la positividad a gametocitos (estadio del parásito que se transmite al mosquito vector) durante la infección submicroscópica como factor pronóstico de persistencia de infección. Usar el diagnóstico de gametocitos como marcador indirecto de la condición del entorno y la capacidad del parásito para sobrevivir, permitiría diferenciar las poblaciones con infección submicroscópica prolongada de aquellas poblaciones con infecciones submicroscópicas que se resuelven solas rápidamente. La importancia de identificar estas infecciones

submicroscópicas persistentes radica en que podrían tener el potencial de contribuir al desarrollo y transmisión de gametocitos en un corto plazo o facilitar la supervivencia del parásito en su estadio asexual dentro del hospedero, garantizando así la inversión futura de recursos del parásito en gametocitos.

**Fase I: Reservorio de gametocitos en infecciones por *P. vivax* en el distrito de Mazán, Loreto.**

En estudios realizados en comunidades cercanas a Iquitos (capital de Loreto) se ha reportado que dos tercios de las infecciones por *P. vivax* con gametocitos están constituidas por infecciones asintomáticas y/o submicroscópicas<sup>15</sup>. Sin embargo, el alto grado de heterogeneidad de la transmisión a escala local y a lo largo de la temporada de transmisión hace necesario una identificación precisa del reservorio de gametocitos en comunidades ribereñas de la Amazonía Peruana, para mejorar la implementación de las estrategias de intervención.

El resultado de este estudio realizado en comunidades ribereñas muestra que en el distrito de Mazán se encontraron gametocitos en 42.5% de las infecciones por *P. vivax*, con diferencias muy marcadas entre dos comunidades de la misma cuenca analizada.

La comunidad de Primero de Enero presentó una proporción de gametocitos significativamente mayor en las infecciones por *P. vivax* (media 68.54%, rango entre barridos 50-85.7%) que Gamitanacocha (media 28.3%, rango entre barridos 8.3-44.4%). La proporción de gametocitos de *P. vivax* encontrada en Gamitanacocha fue cercana a lo reportado previamente en las comunidades de Cahuide y Lupuna por Rovira<sup>15</sup>, en donde se encontró proporciones de gametocitos del 22,4% [3%-50%] y 35,9% [19%-61,5%] respectivamente.

Esta diferencia se podría atribuir principalmente a la intensidad de transmisión y al alto riesgo de infección por *P. vivax* que se había registrado en el distrito Mazán en el 2015. Además, el criterio de selección de las cuatro comunidades se basó en un incremento inusual del número de casos de malaria, desencadenando el inicio de las intervenciones de DAC. Por lo tanto, es probable que este estudio captara el inicio de los brotes de malaria en las comunidades del distrito de Mazán.

En Cahuide y Lupuna el diseño de estudio fue de tipo cohorte por 1 año con DAC cada 3 meses durante el 2013; mientras que en el presente estudio se realizó una cohorte con cuatro barridos de DAC con intervalos de 10 días entre Junio y Julio del 2015 (temporada de alta transmisión). A su vez, la diferencia en la distribución de edades entre las distintas localidades, y el uso de métodos moleculares sensibles para detectar infecciones de baja densidad podrían arrojar resultados variados entre diferentes estudios.

Es curioso que a pesar que Gamitanacocha, Primero de Enero y Libertad son parte de una misma microcuenca del río Mazán, Gamitanacocha es significativamente menos susceptible a las infecciones con gametocitos por *P. vivax* que Primero de Enero y Libertad durante temporada de alta transmisión. Este hecho podría estar influenciado principalmente por la heterogeneidad en los factores de riesgo a nivel micro-geográfico en la Amazonía peruana, como movilización y ocupación<sup>47</sup>.

Gamitanacocha es una comunidad pequeña con baja transmisión de la malaria comparada a Libertad y Primero de Enero en la microcuenca del río Mazán. Se ha reportado que esta comunidad tiene un alto movimiento

poblacional hacia Maucallacta<sup>47</sup>, una comunidad más cercana con bajo riesgo de malaria durante el periodo de estudio según los registros del RHDL. Lo que sugiere que esta población tiene una baja vulnerabilidad (es decir, la importación de malaria), que posiblemente se vea reflejado en un bajo número de infecciones que desarrollan gametocitos.

Por otro lado, Libertad y Primero de Enero son comunidades contiguas con la mayor transmisión de la malaria en la microcuenca del río Mazán, sus pobladores tienen como principal ocupación las actividades extractivas. Estas actividades se ubican por lo general en áreas hiperendémicas<sup>49</sup>, generando alta vulnerabilidad de infección en los trabajadores que viajan a estos lugares, y por ende susceptibles a importar nuevas cepas del parásito a su lugar de origen. Se ha documentado que la variación antigénica de la cepa parasitaria podría ayudar a evadir la inmunidad, sugiriendo que la diversidad genética promueve la persistencia de las infecciones, y por ende el desarrollo de infecciones submicroscópicas, lo que explicaría el predominio de infecciones submicroscópicas con gametocitos en Libertad y Primero de Enero. Este hecho coincide con los hallazgos sobre la alta diversidad y la importación de infecciones en Libertad reportados por Manrique *et al.*<sup>50</sup>.

Mayores a 5 años de edad son más susceptible a portar una infección con gametocitos, con picos elevados entre los rangos 5-14 años edad en Libertad y Urco Miraño, 15-39 años de edad en Primero de Enero y

mayores a 40 años de edad en Gamitanacocha. Esto nos demuestra, que la Amazonía Peruana es altamente heterogénea en su transmisión relacionado con la adquisición de inmunidad, y podría estar influenciada por la edad. Probablemente por el diferente nivel de exposición de los individuos a las picaduras de *Anopheles darlingi*. Se ha reportado que los individuos de más de 15 años trabajaban principalmente en actividades agrícolas, forestales y pesqueras, lo que puede aumentar la exposición a picadura<sup>47</sup>. Esto sugiere que conforme aumente la edad y el grado de exposición, los individuos podrían adquirir una inmunidad protectora contra los gametocitos. Lo que podría tener un impacto sobre la densidad parasitaria y gametocitaria, en menores a 5 años de edad ambas densidades son elevadas y disminuye conforme la edad aumenta.

En el distrito de Mazán se observó altas tasas de infecciones por *P. vivax* submicroscópicas y asintomáticas. Todas las comunidades contribuyen con su reservorio silencioso con gametocitos en igual proporción. Asintomáticos y submicroscópicos contribuyen el 52.7% de las infecciones con gametocitos por *P. vivax* en Mazán durante la temporada de alta transmisión. En contraste, asintomáticos y submicroscópicos en Cahuide y Lupuna contribuyeron con dos tercios de las infecciones con gametocitos por *P. vivax*<sup>15</sup>, lo que podría sugerir que las infecciones de Cahuide y Lupuna han generado mayor inmunidad protectora, lo que podría permitir al parásito sobrevivir a bajas parasitemias sin generar síntomas. Se ha sugerido que, tras un periodo de reducción de la transmisión de la malaria, los huéspedes podrían tener un mejor control de la parasitemia y la

enfermedad clínica siempre que persista cierta inmunidad, se prolongue el tiempo antes de la reinfección y las nuevas infecciones sean probablemente monoclonales<sup>8</sup>. De hecho, Cahuide y Lupuna experimentó una reducción del tamaño efectivo de la población de parásitos debido a un evento de cuello de botella como resultado de los programas de control de 2005-2011<sup>51</sup>.

## ***Fase II: Infecciones submicroscópicas persistentes por P. vivax***

La evaluación de la presencia de gametocitos en infecciones submicroscópicas persistentes y no persistentes por *P. vivax* representa el primer estudio prospectivo de comparación de proporciones que asocia la presencia de gametocitos como factor pronóstico de persistencia submicroscópica de al menos 10 días más. Además, también se exploró los factores sociodemográficos que se conocen que tienen un efecto epidemiológico en las infecciones por malaria y que podrían ser relevantes para el desarrollo de la condición de persistencia submicroscópica.

Para lograr esto, se contó con 68 individuos con infección submicroscópica persistente, que representó el 7.3% de la población que desarrolló infección submicroscópica persistente por *P. vivax*, y 62 individuos con infecciones submicroscópicas no persistentes, provenientes de un estudio matriz realizado en el distrito de Mazán, Loreto, a los cuales se les realizó detección para gametocitos femeninos maduros durante su seguimiento.

La presencia de gametocitos en infecciones submicroscópicas persistentes se determinó cuando el gametocito se ubicó al menos 10 días previos a la última infección positiva a *P. vivax* disponible, mientras que en los no persistentes la presencia de gametocitos se determinó en su única infección positiva a *P. vivax*. Esta condición en la asignación de la presencia de gametocitos en infecciones submicroscópicas persistentes, permitió

examinar la presencia de gametocitos como factor pronóstico de persistencia de infección de al menos 10 días más, es decir, se tiene mayor probabilidad de desarrollar una infección persistente submicroscópica; si se es positivo en un momento a gametocito durante una infección.

#### Persistencia submicroscópica por *P. vivax*

El 7.3% de la población desarrolló infección submicroscópica persistente por *P. vivax*.

Este trabajo se ve limitado en reportar el tiempo promedio transcurrido desde la identificación de las infecciones submicroscópicas por *P. vivax* hasta su negativización. Esto se debe a que el presente estudio se origina de un estudio epidemiológico que aborda la estimación de la proporción de infecciones por malaria después de una estrategia de DAC, y no un seguimiento longitudinal que permita explorar la dinámica completa de la infección por *P. vivax*. Sin embargo, esta cohorte con 4 barridos transversales cada 10 días proporcionó una oportunidad única para analizar la prevalencia de las infecciones submicroscópicas persistentes por *P. vivax* y la descripción del reservorio infeccioso en cuatro comunidades del distrito de Mazán durante Junio y Julio del 2015, temporada de alta transmisión de la malaria. Esta cohorte posee la ventaja de tener 4 cortes transversales estrechos– por semana y no por mes o meses, lo que facilita el seguimiento de los episodios de infección.

Asimismo, no se puede excluir la posibilidad que un individuo caracterizado con infección submicroscópica persistente haya adquirido una nueva infección durante el seguimiento, ya sea por recaída o reinfección; el

genotipificado en estas infecciones es difícil por las bajas parasitemias, lo anterior podría generar una sobrestimación de la persistencia reportada. Sin embargo, dado que el tiempo de seguimiento no fue muy extenso, la posibilidad de una nueva infección es menos probable.

A pesar de estas limitaciones, estudios han sugerido una corta duración de la infección por *P. vivax* en estadio sanguíneo, con un límite inferior de 24 días en Papúa Nueva Guinea y 29 días en Tailandia<sup>26</sup>. Para la Amazonía Peruana reportamos que el 7.3% de la población del distrito de Mazán con infección submicroscópica persiste por *P. vivax* tiene al menos 10 días de persistencia, Anexo 7.

Un estudio de nuestro grupo de investigación que evaluó la evolución de la detectabilidad de las infecciones submicroscópicas en el distrito de Mazán, reportó que las infecciones submicroscópicas suele volverse indetectables en el tiempo, y una minoría se vuelven detectables por microscopía<sup>16</sup>. El presente trabajo corrobora este hallazgo, ya que el 6.54% de la población con infección submicroscópica se resolvió espontáneamente en menos de 10 días y 4.5% de la población con parasitemias submicroscópica se volvió microscópica.

Este estudio excluyó individuos que en algún momento de los 4 barridos de DAC resultaron positivos a *P. vivax* por microscopía y qPCR, ya que las densidades parasitarias de estas infecciones estarían influenciadas por el tratamiento antimalárico, lo que adicionaría un sesgo en determinar si

una infección fue persistente por el curso natural o producto de una estrategia de supervivencia del parásito o se interrumpiera la infección.

Es necesario más estudios sobre las infecciones submicroscópicas de manera longitudinal y conocer su contribución a la transmisión. Si bien se ha detectado la presencia de gametocitos en este tipo de infecciones, aún no se sabe si existe un umbral mínimo de densidad de gametocitos para que un individuo infectado pueda transmitir los estadios sexuales al mosquito. De este modo, orientar la toma de decisiones de tratar o no estas infecciones.

#### Densidad de gametocitos en infecciones submicroscópicas persistentes

La mediana de la densidad de gametocitos de infecciones submicroscópicas persistentes no mostró diferencia significativa con la mediana de la densidad de gametocitos de infección submicroscópica no persistente. La mediana de la densidad de gametocitos de infecciones persistentes fue 0.28 gametocitos/ul (RIQ 0.84) y 0.68 gametocitos/ul (RIQ 1.48) para no persistentes.

Si bien la mediana de la densidad de gametocitos/ul reporta valores bajos, la distribución de los datos de la densidad en el grupo persistente son amplios a diferencia de los no persistentes (Figura 8). Se conoce que la asociación entre la densidad de gametocitos y la tasa de infección del mosquito no es muy fuerte y es más variable a bajas concentraciones de gametocitos<sup>14</sup>. Sin embargo, dos estudios que relacionaron las densidades de gametocitos con las tasas de infección de los mosquitos mediante

experimentos de alimentación por membrana utilizando herramientas de detección molecular indicaron que la infección de los mosquitos es común por debajo del umbral microscópico de detección de gametocitos. Estas observaciones de campo fueron confirmadas por diluciones en serie de gametocitos cultivados que se ofrecieron a los mosquitos en condiciones de laboratorio. En los experimentos de campo y de laboratorio, los mosquitos se infectaron después de alimentarse con sangre que contenía gametocitos en una concentración inferior a 1 gametocito/ $\mu\text{l}$ <sup>13</sup>, lo que sugiere que las infecciones submicroscópicas por *P. vivax* persistentes y no persistentes que albergan gametocitos podrían contribuir a la transmisión de malaria. No obstante, es necesario mencionar que la infecciosidad de los gametocitos maduros femeninos detectados en este estudio podría variar por factores intrínsecos del parásito, factores inmunes del hospedero y del mosquito, que limiten el éxito de infectar al mosquito<sup>14</sup>.

Aplicando la teoría evolutiva al parásito *P. vivax*, planteada por Schneider *et.al.*, sobre la plasticidad adaptativa en la tasa de conversión de gametocitos de los parásitos de la malaria, se esperaba encontrar que las infecciones submicroscópicas no persistentes priorizaran la asignación de recursos a la reproducción, en una inversión terminal antes de su eliminación espontánea. No obstante, pocas infecciones no persistentes por *P. vivax* reportaron positividad a gametocitos en su única infección. Esto concuerda con lo sugerido por Schneider *et.al.*, sobre lo difícil que puede resultar para el parásito en su mala condición hacer una inversión terminal.

En la actualidad, medir la densidad de gametocitos, tanto de los gametocitos femeninos como masculinos es de suma importancia para conocer el potencial de transmisión. Se conoce hasta el momento que la proporción de mosquitos infectados se determina por la densidad de gametocitos femeninos, sin embargo; la transmisión a partir de bajas densidades de gametocitos puede verse impedida por la falta de gametocitos masculinos<sup>52</sup>. Por lo que, si bien en este estudio se ha encontrado densidades máximas de 74,79 gametocitos/  $\mu$ L femeninos maduros en infecciones persistentes y 11,72 gametocitos/  $\mu$ L en infecciones no persistentes; esto no asegura que la densidad de gametocitos masculinos sea suficiente para infectar mosquitos.

#### Diferencia en la mediana de la densidad de gametocitos dentro de una infección persistente

Se encontró una tendencia a disminuir la densidad de gametocitos en el curso de una infección submicroscópica por *P. vivax* persistente. Lo que sugiere que infecciones submicroscópicas persistentes que se resuelven solas tendrían mayor probabilidad de infectar mosquitos al inicio o en el curso de la infección que al final. Sería interesante conocer como la proporción de parásitos asexuales/sexuales varía en el curso de la infección, y si los recuentos de gametocitos femeninos y masculinos maduros siguen el patrón de oscilación de los parásitos asexuales. Recalcar que en las infecciones submicroscópicas por *P. vivax*, analizadas en este estudio se observó en algunos casos discontinuidad en la presencia de gametocitos y en otros una prolongada persistencia.

### Factores de riesgo asociados a la persistencia submicroscópica

El análisis multivariado revela que la presencia de gametocitos es un factor predictor de infecciones submicroscópicas por *P. vivax* persistentes de al menos 10 días más. Este hallazgo podría cobrar sentido en la hipótesis planteada por Babiker *et al.*, que el parásito invierte en gametocitos para garantizar que la densidad de parásito asexuales se mantenga baja durante la recrudescencia, lo que podría permitir a los parásitos mantener su número total por debajo del umbral de reactivación del sistema inmunitario. Esta estrategia del parásito asexual de persistir a bajas densidades da poca probabilidad para que incluso las técnicas moleculares puedan detectar la infección, sin embargo, ya que las técnicas moleculares que detectan transcritos son más sensibles que las que detectan ADN, la producción de gametocitos de estas infecciones podría delatar la estrategia de supervivencia del parásito <sup>27</sup>.

Los factores sociodemográficos descritos en este estudio no se asociaron con infecciones submicroscópicas persistentes por *P. vivax*. Se debe seguir explorando la relación de los factores pronósticos y la persistencia submicroscópica por *P. vivax* con un número muestral más grande para corroborar el resultado encontrado en el presente estudio. Se recomienda incluir factores como grado de inmunidad (niveles de anticuerpos IgG, IgM y antecedentes de malaria) y el grado de exposición a mosquitos (Tasa de inoculación entomológica) en un nuevo análisis de factores pronóstico a desarrollar persistencia de infección submicroscópica,

ya que se conoce que estos factores podrían modificar el curso de una infección<sup>8,53</sup>.

Para estudios posteriores se recomienda abordar un seguimiento por 2 años con diagnósticos semanales una vez detectada la infección hasta la confirmación de su negativización durante 3 semanas consecutivas por PCR, así capturar el inicio y fin de una infección submicroscópica por *P. vivax*. Se necesita comprobar si tener gametocitos en el curso de una infección podría proporcionar una capacidad pronóstico de persistencia submicroscópica mayor a los 10 días.

Además, se sugiere enfocarse en estudios longitudinales de infecciones asintomáticas submicroscópicas persistentes por *P. vivax* que puede ser un objetivo clave para eliminar la malaria en la Amazonía Peruana, con la finalidad de identificar aquellos factores inmunológicos humanos (medición de citoquinas y anticuerpos) que afectan la producción de gametocitos e infectividad de mosquitos a lo largo de la infección.

## VIII Conclusiones

- Las infecciones asintomáticas y submicroscópicas por *P. vivax* representan la mitad de las infecciones positivas a *P. vivax* con gametocitos en las comunidades de Gamitanacocha, Libertad, Primero de Enero y Urco Mirañó.
- La prevalencia de gametocitos es mayor en el rango 15-39 años de edad en comparación con menores de 5 años. Por comunidad, la prevalencia de gametocitos es mayor en el rango 5-14 años de edad en Libertad y Urco Mirañó, mayores a 40 años de edad en Gamitanacocha y 15-39 años de edad en Primero de Enero.
- La densidad de gametocitos en menores de 5 años es menor comparado al rango 15-39 años de edad. La densidad de gametocitos entre infecciones persistentes y no persistentes, submicroscópicas, no muestra diferencia significativa.
- La densidad de los gametocitos en dos momentos de la infección submicroscópica persistente no presenta una tendencia definida.
- Hay asociación entre infección submicroscópica persistente *P. vivax* y presencia de gametocitos.
- La presencia de gametocitos en infecciones submicroscópicas persistentes está relacionado a al menos 10 días más de persistencia.
- No se observó una asociación entre factores sociodemográficos (comunidad, sexo, edad, ocupación, viaje en el último mes y episodio de malaria en el último año) y la persistencia de infecciones submicroscópicas por *P. vivax*.

## IX Limitaciones

- La proporción de individuos positivos a gametocitos podría estar sesgada por la sensibilidad de la qPCR que detecta la parasitemia del estadio sanguíneo - cuanto más sensible se identificará más infecciones por *P. vivax* submicroscópicas que podrán ser evaluadas para diagnóstico de gametocitos.
- La detección de gametocitos continúa siendo un indicador indirecto sobre el reservorio infeccioso. Conocer la infectividad hacia un mosquito requiere de ensayos de alimentación artificial por membrana, ya que existen factores como inmunidad del hospedero y del vector que intervienen en el éxito de infección de un mosquito.
- La estrategia de muestreo por 4 barridos de DAC cada 10 días permite obtener información epidemiológica del transporte de parásitos y gametocitos, pero no permite calcular la duración de una infección persistente, así como capturar la inversión de los estadios asexuales a sexuales durante el curso de una infección. Se recomienda realizar un seguimiento por 2 años con evaluaciones semanales una vez detectada la infección hasta la confirmación de su negativización durante 3 semanas consecutivas por PCR. Así como, detectar y cuantificar la densidad de los estadios asexuales y estadios sexuales inmaduros.
- Este estudio no puede distinguir si la persistencia de una infección submicroscópica por *P. vivax* se debe a una recaída, recurrencia o reinfección. Se recomienda identificar marcadores serológicos sensibles de infección reciente para *P. vivax* para discriminar las infecciones ocasionadas por

recaída de las nuevas infecciones. Así como ejecutar herramientas de genotipificación para distinguir reinfecciones.

## X Referencias bibliográficas

1. Lin, J. T., Saunders, D. L. & Meshnick, S. R. The role of submicroscopic parasitemia in malaria transmission: what is the evidence? *Trends Parasitol.* **30**, 183–190 (2014).
2. Nguyen, T.-N. *et al.* The persistence and oscillations of submicroscopic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections over time in Vietnam: an open cohort study. *Lancet Infect. Dis.* **18**, 565–572 (2018).
3. Barbosa, S. *et al.* Epidemiology of Disappearing *Plasmodium vivax* Malaria: A Case Study in Rural Amazonia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, (2014).
4. Drakeley, C., Gonçalves, B., Okell, L. & Slater, H. Understanding the Importance of Asymptomatic and Low- Density Infections for Malaria Elimination. *Malar. Elimin. - Leap Forw.* (2018)
5. Babiker, H. A., Schneider, P. & Reece, S. E. Gametocytes: insights gained during a decade of molecular monitoring. *Trends Parasitol.* **24**, 525–530 (2008).
6. Ouédraogo, A. L. *et al.* Substantial contribution of submicroscopical *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage to the infectious reservoir in an area of seasonal transmission. *PloS One* **4**, e8410 (2009).
7. Karl, S. *et al.* A Sub-Microscopic Gametocyte Reservoir Can Sustain Malaria Transmission. *PLoS ONE* **6**, (2011).
8. Okell, L. C. *et al.* Factors determining the occurrence of submicroscopic malaria infections and their relevance for control. *Nat. Commun.* **3**, 1237 (2012).
9. Churcher, T. S. *et al.* Predicting mosquito infection from *Plasmodium falciparum* gametocyte density and estimating the reservoir of infection. *eLife* **2**, (2013).

10. Bousema, T. & Drakeley, C. Epidemiology and Infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* Gametocytes in Relation to Malaria Control and Elimination. *Clin. Microbiol. Rev.* **24**, 377–410 (2011).
11. Schneider, P. *et al.* Submicroscopic *Plasmodium falciparum* gametocyte densities frequently result in mosquito infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **76**, 470–474 (2007).
12. Wampfler, R. *et al.* Strategies for Detection of *Plasmodium* species Gametocytes. *PLoS ONE* **8**, (2013).
13. Schneider, P. *et al.* Adaptive plasticity in the gametocyte conversion rate of malaria parasites. *PLOS Pathog.* **14**, e1007371 (2018).
14. Schneider, P. & Reece, S. E. The private life of malaria parasites: Strategies for sexual reproduction. *Mol. Biochem. Parasitol.* **244**, 111375 (2021).
15. Rovira-Vallbona, E. *et al.* Predominance of asymptomatic and sub-microscopic infections characterizes the *Plasmodium* gametocyte reservoir in the Peruvian Amazon. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11**, e0005674 (2017).
16. Jose Luis Perez Martinez. Factores asociados a la evolución de infecciones subpatentes de malaria en la Amazonía peruana”. (Universidad Peruana Cayetano Heredia, 2020).
17. Camargo, E. P., Alves, F. & da Silva, L. H. P. Symptomless *Plasmodium vivax* infections in native Amazonians. *The Lancet* **353**, 1415–1416 (1999).
18. Cucunubá, Z. M. *et al.* Asymptomatic *Plasmodium* spp. infection in Tierralta, Colombia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **103**, 668–673 (2008).

19. Moreno-Gutierrez, D. *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* **15**, (2018).
20. Slater, H. C. *et al.* The temporal dynamics and infectiousness of subpatent *Plasmodium falciparum* infections in relation to parasite density. *Nat. Commun.* **10**, (2019).
21. World malaria report 2020. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240015791>.
22. Adams, J. H. & Mueller, I. The Biology of *Plasmodium vivax*. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **7**, a025585 (2017).
23. Elimination of *Plasmodium vivax* Malaria: Problems and Solutions | IntechOpen. <https://www.intechopen.com/online-first/elimination-of-plasmodium-vivax-malaria-problems-and-solutions>.
24. Zhou, Z. *et al.* Assessment of submicroscopic infections and gametocyte carriage of *Plasmodium falciparum* during peak malaria transmission season in a community-based cross-sectional survey in western Kenya, 2012. *Malar. J.* **15**, (2016).
25. Crutcher, J. M. & Hoffman, S. L. Malaria. in *Medical Microbiology* (ed. Baron, S.) (University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996).
26. White, M. T. *et al.* *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infection dynamics: re-infections, recrudescences and relapses. *Malar. J.* **17**, (2018).
27. Eksi, S. *et al.* *Plasmodium falciparum* Gametocyte Development 1 (Pfgdv1) and Gametocytogenesis Early Gene Identification and Commitment to Sexual Development. *PLoS Pathog.* **8**, (2012).

28. McKenzie, F. E., Jeffery, G. M. & Collins, W. E. PLASMODIUM VIVAX BLOOD-STAGE DYNAMICS. *J. Parasitol.* **88**, 521–535 (2002).
29. Ngwa, C. J., Rosa, T. F. D. A. & Pradel, G. The Biology of Malaria Gametocytes. (2016).
30. Graumans, W., Jacobs, E., Bousema, T. & Sinnis, P. When Is a Plasmodium-Infected Mosquito an Infectious Mosquito? *Trends Parasitol.* **36**, 705–716 (2020).
31. Koepfli, C. & Yan, G. Plasmodium Gametocytes in Field Studies: Do We Measure Commitment to Transmission or Detectability? *Trends Parasitol.* **34**, 378–387 (2018).
32. Olliaro, P. L. *et al.* Implications of Plasmodium vivax Biology for Control, Elimination, and Research. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **95**, 4–14 (2016).
33. Pett, H. *et al.* Comparison of molecular quantification of Plasmodium falciparum gametocytes by Pfs25 qRT-PCR and QT-NASBA in relation to mosquito infectivity. *Malar. J.* **15**, (2016).
34. Santolamazza, F. *et al.* Detection of Plasmodium falciparum male and female gametocytes and determination of parasite sex ratio in human endemic populations by novel, cheap and robust RTqPCR assays. *Malar. J.* **16**, 468 (2017).
35. Schneider, P. *et al.* Quantification of Plasmodium falciparum gametocytes in differential stages of development by quantitative nucleic acid sequence-based amplification. *Mol. Biochem. Parasitol.* **137**, 35–41 (2004).

36. Maeno, Y. *et al.* A dried blood sample on filter paper is suitable for detecting *Plasmodium falciparum* gametocytes by reverse transcription polymerase chain reaction. *Acta Trop.* **107**, 121–127 (2008).
37. Stone, W. *et al.* A Molecular Assay to Quantify Male and Female *Plasmodium falciparum* Gametocytes: Results From 2 Randomized Controlled Trials Using Primaquine for Gametocyte Clearance. *J. Infect. Dis.* **216**, 457–467 (2017).
38. White, N. J. *et al.* Assessment of therapeutic responses to gametocytocidal drugs in *Plasmodium falciparum* malaria. *Malar. J.* **13**, 483 (2014).
39. Males, S., Gaye, O. & Garcia, A. Long-Term Asymptomatic Carriage of *Plasmodium falciparum* Protects from Malaria Attacks: a Prospective Study among Senegalese Children. *Clin. Infect. Dis.* **46**, 516–522 (2008).
40. Felger, I. *et al.* The Dynamics of Natural *Plasmodium falciparum* Infections. *PLoS ONE* **7**, (2012).
41. Doolan, D. L., Dobaño, C. & Baird, J. K. Acquired immunity to malaria. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 13–36, Table of Contents (2009).
42. Aguas, R. *et al.* Infectivity of Chronic Malaria Infections and Its Consequences for Control and Elimination. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **67**, 295–302 (2018).
43. Björkman, Asymptomatic low-density malaria infections: a parasite survival strategy? - *The Lancet Infectious Diseases*. *P485-486, May 01*, (2018).
44. Nassir, E. *et al.* Impact of genetic complexity on longevity and gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum* during the dry and transmission-free season of eastern Sudan. *Int. J. Parasitol.* **35**, 49–55 (2005).

45. Ministerio de Salud. *Norma técnica para la atención de la malaria y malaria severa en el Perú*. <http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/4373.pdf> (2015).
46. Moreno-Gutierrez, D. *et al.* Economic costs analysis of uncomplicated malaria case management in the Peruvian Amazon. *Malar. J.* **19**, 161 (2020).
47. Carrasco-Escobar, G. *et al.* Micro-epidemiology and spatial heterogeneity of *P. vivax* parasitaemia in riverine communities of the Peruvian Amazon: A multilevel analysis. *Sci. Rep.* **7**, 8082 (2017).
48. Saavedra, M. P. *et al.* Higher risk of malaria transmission outdoors than indoors by *Nyssorhynchus darlingi* in riverine communities in the Peruvian Amazon. *Parasit. Vectors* **12**, 374 (2019).
49. Parker, B. S. *et al.* Hyperendemic malaria transmission in areas of occupation-related travel in the Peruvian Amazon. *Malar. J.* **12**, 178 (2013).
50. Manrique Valverde, Paulo. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE PLASMODIUM VIVAX EN CUATRO COMUNIDADES RIBEREÑAS DEL DISTRITO DE MAZÁN EN LA AMAZONÍA PERUANA. (Universidad Peruana Cayetano Heredia, 2018).
51. Delgado-Ratto, C. *et al.* Population Genetics of *Plasmodium vivax* in the Peruvian Amazon. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, e0004376 (2016).
52. Bradley, J. *et al.* Predicting the likelihood and intensity of mosquito infection from sex specific *Plasmodium falciparum* gametocyte density. *eLife* **7**, e34463 (2018).
53. Pinkevych, M. *et al.* Time-to-infection by *Plasmodium falciparum* is largely determined by random factors. *BMC Med.* **13**, 19 (2015).

## XI Anexos

### Anexo 1. Criterios de inclusión y exclusión de individuos con infección submicroscópica por *P. vivax*.

Individuos observados hasta en 4 intervenciones de DAC	
<b>Legenda</b> 	
Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
<p><b>No persistente</b> Individuo con infección submicroscópica por <i>P. vivax</i> (Mx-/qPCR+) en una intervención de DAC entre intervenciones de DAC con diagnóstico negativo (Mx-/qPCR-).</p> <p>4 intervenciones de DAC  </p>	<p>Individuos con un único diagnóstico positivo (Mx-/qPCR+) en la primera o última intervención de DAC.</p> <p>4 intervenciones de DAC  </p>
<p><b>Persistente</b> Individuo con infección submicroscópica por <i>P. vivax</i> (Mx-/qPCR+) consecutiva en la siguiente intervención de DAC (después 10 días o hasta 20 días).</p> <p>4 intervenciones de DAC  </p> <p>4 intervenciones de DAC  </p>	<p>Individuos con diagnóstico negativo durante el seguimiento</p> <p>4 intervenciones de DAC  </p> <p>Individuo con infección detectada por microscopia durante el seguimiento.</p> <p>4 intervenciones de DAC  </p> <p>Individuos con resultado positivo a <i>P. falciparum</i> durante el seguimiento.</p> <p>4 intervenciones de DAC  </p> <p>Individuos con infección mixta durante el seguimiento.</p> <p>4 intervenciones de DAC  </p> <p>Individuos con infección submicroscópica por <i>P. vivax</i> (Mx-/qPCR+) discontinua durante el seguimiento (después de 30 días)</p> <p>4 intervenciones de DAC  </p>

**Anexo 2. Criterios para caracterizar ausencia y presencia de gametocitos en individuos con infección persistente y no persistente submicroscópica por *P. vivax***



**Anexo 3. Componentes de la reacción de tratamiento de ARN con ADNsa para la digestión de una muestra.**

<b>Componentes de Master Mix</b>	<b>Volumen</b>
<b>TURBO ADNse enzyme</b>	<b>1 <math>\mu</math>L</b>
<b>10X Buffer</b>	<b>3 <math>\mu</math>L</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>1 <math>\mu</math>L</b>
<b>Volumen de Master Mix</b>	<b>5 <math>\mu</math>L</b>

**Anexo 4. Primers y sondas específicas de gametocito pfs25 y pvs25 RT-qPCR.**

<b>Especie</b>	<b>Primer</b>	<b>Secuencia (5'&gt;3')</b>
<b><i>P. falciparum</i></b>	<b><i>pfs25_fw</i></b>	GAA ATC CCG TTT CAT ACG CTT G
	<b><i>pfs25_rev</i></b>	AGT TTT AAC AGG ATT GCT TGT ATC TAA
	<b><i>pfs25_probe</i></b>	HEX-TGT AAG AAT GTA ACT TGT GGT AAC GGT-BHQ1
<b><i>P. vivax</i></b>	<b><i>pvs25_fw</i></b>	ACA CTT GTG TGC TTG ATG TAT GTC
	<b><i>pvs25_rev</i></b>	ACT TTG CCA ATA GCA CAT GAG CAA
	<b><i>pvs25_probe</i></b>	FAM-TGC ATT GTT GAG TAC CTC TCG GAA-BHQ1

**Anexo 5. Volúmenes RT + RT- y Mastermix para una reacción.**

<b>MasterMix RT+</b>		
<b>Componente</b>	<b>Concentración final</b>	<b>V (µl)</b>
RT-qPCR Mix 5x	1x	4
Pvs25_F_W (10µM)	0.4µM	0.8
Pvs25_R_W (10µM)	0.4µM	0.8
Pfs25_F_W (10µM)	0.4µM	0.8
Pfs25_R_W (10µM)	0.4µM	0.8
Pvs25_probe (10µM)	0.2µM	0.4
Pfs25_probe (10µM)	0.2µM	0.4
RT Enzyme 200x	1x	0.1
H2O		6.9
<b>TOTAL</b>		<b>15</b>

<b>MasterMix RT-</b>		
<b>Componente</b>	<b>Concentración final</b>	<b>V (µl)</b>
RT-qPCR Mix 5x	1x	4
Pvs25_F_W (10µM)	0.4µM	0.8
Pvs25_R_W (10µM)	0.4µM	0.8
Pfs25_F_W (10µM)	0.4µM	0.8
Pfs25_R_W (10µM)	0.4µM	0.8
Pvs25_probe (10µM)	0.2µM	0.4
Pfs25_probe (10µM)	0.2µM	0.4
RT Enzyme 200x	1x	-
H2O		7
<b>TOTAL</b>		<b>15</b>

**Anexo 6. Condiciones de ciclado de la reacción RT-qPCR.**

<b>Etapas</b>		<b>Tiempo</b>	<b>Temperatura</b>
<b>Transcripción reversa</b>		10 minutos	50°C
<b>Denaturación</b>		1 minuto	95°C
<b>PCR (45 Ciclos)</b>	<b>Denaturación</b>	5 segundos	95°C
	<b>Hibridación/ Extensión/ Cuantificación de fluorescencia</b>	30 segundos	58°C
<b>Refrigeración</b>		30 segundos	37°C

**Anexo 7. Descripción de las infecciones submicroscópicas no persistentes y persistentes por *P. vivax* diagnosticadas por qPCR durante 4 barridos de DAC en el distrito de Mazán, Loreto.**

Seguimiento con intervalos de 10 días							
		Barridos				N= 130	%
		1DAC	2DAC	3DAC	4DAC		
<b>No persistente</b>						34	26.2
						28	21.5
<b>Persistente</b>		<b>10 días</b> de infección observada				18	13.8
						9	6.9
						10	7.7
		<b>20 días</b> de infección observada				10	7.7
						3	2.3
						3	2.3
		<b>30 días</b> de infección observada				3	2.3
						7	5.4
						2	1.5
						3	2.3

	Infección submicroscópica por <i>P. vivax</i>
	Sin muestra disponible o negativo a Pv
	Negativo a Pv

**Anexo 8. Distribución de individuos con al menos una infección por *P. vivax* por qPCR y microscopía según su tipo de infección.**

Individuos con al menos una infección por <i>P. vivax</i> en todas las comunidades y 4 barridos de DAC								
	Infección mixta (Pv-Pf)	Infección persistente		Infección no persistente		Sin clasificación		Total
<b>n(%)</b>	21 (5.5%)	139 (36.1%)		83 (21.6%)		142 (36.9%)		385 (100%)
		Submicroscópica	Microscópica	Submicroscópica	Microscópica	Submicroscópica	Microscópica	
		102	37	63	20	116	26	364
<b>Excluidos</b>	21	34	37	1	20	116	26	
<b>Incluidas</b>		68		62				130

En celeste se hace mención al número de individuos incluidos en la exploración de las infecciones submicroscópicas persistentes por *P. vivax* (Fase II).

a. Individuos con infección microscópica persistente conformados por: 9 individuos detectados por microscopía en su primer diagnóstico y 20 individuos con infección submicroscópica que se convirtió en detectable por microscopía (5: en un lapso de 10 días y 15: entre 20 a 30 días). Los individuos con microscopía positiva recibieron tratamiento antimalárico.

b. En individuos con infección sin clasificación no se logró determinar si la única infección durante el seguimiento correspondía a una infección persistente o no persistente.