

**UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA**  
**“ALBERTO CAZORLA TALLERÍ”**



**“Factores asociados a la evolución de infecciones subpatentes de malaria  
en la Amazonía peruana”**

**Jose Luis Perez Martinez**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**Asesora:**

Dra. Dionicia Gamboa Vilela

**Co-asesores:**

Msc. Juan Jose Contreras Mancilla

PhDc. Gabriel Carrasco-Escobar

**Lima - Perú**

**2020**

**JURADO CALIFICADOR:**

**Presidente:** Teresa Barreto Gaviria

**Secretario:** César Cárcamo Cavagnaro

**Vocal:** Alejandro Llanos-Cuentas

## DEDICATORIA

*En memoria de mis padres, quienes son mi motivación y un gran ejemplo a seguir.  
A mi hermano quien ha sido testigo de las adversidades y el esfuerzo para llegar hasta aquí.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Un agradecimiento a mis padres y hermano por el apoyo y la comprensión que tuvieron durante mi carrera y durante la elaboración de la presente tesis, con mención especial a mi padre que atraviesa una etapa dura de su vida, pero con el apoyo de nuestra familia podrá reponerse. De igual forma agradezco al Laboratorio de Malaria a cargo de la Dra. Dionicia Gamboa por su gran paciencia y comprensión, también a Msc. Juan José Contreras y Ph.Dc. Gabriel Carrasco por su gran apoyo con las dificultades que tuve para la elaboración y finalización de la tesis y por la experiencia académica que compartieron conmigo en este proceso. Un agradecimiento especial al proyecto “Círculo de Investigación: Hacia la Eliminación de la Malaria en el Perú” bajo la dirección del Dr. Llanos por permitirme emplear los datos de sus investigaciones para este estudio. Comparto ese agradecimiento con mis compañeros de Laboratorio Anthony Gave, Milagros Sánchez, Jhonathan Alarcón y Ricardo Antiparra por su amistad, su colaboración y el gran ánimo que me dieron en este proyecto.

## **FINANCIAMIENTO**

- Esta tesis es financiada por el Circulo de Investigación: “Hacia la Eliminación de la Malaria”-Convenio 008-2014-FONDECYT

# ÍNDICE

<b>CAPITULO I: INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Antecedentes .....	1
1.1.1. Epidemiología de Malaria. ....	1
1.1.2. Malaria en Loreto. ....	2
1.1.3. Sintomatología de Malaria. ....	3
1.1.4. Ciclo infectivo de la Malaria. ....	3
1.1.5. Métodos de detección de Malaria en la Amazonía. ....	5
1.1.6. Infecciones subpatentes en la Amazonía. ....	8
1.1.7. Factores que contribuyen a la aparición de infecciones subpatente de <i>P. vivax</i> : .....	9
1.1.8. Recaídas y evolución de las infecciones subpatentes .....	10
1.1.9. Detección Activa de Casos. ....	11
1.2 Planteamiento del Problema .....	13
1.3 Justificación del Estudio .....	13
<b>CAPITULO II: HIPOTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
2.1 Hipótesis.....	14
2.2. Objetivos .....	14
2.2 Objetivos Generales .....	14
2.3 Objetivos Específicos .....	14
<b>CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
3.1 Diseño de estudio .....	15
3.2 Toma de muestras .....	16
3.3 Procedimientos de laboratorio .....	17
3.3.1. Microscopía .....	17
3.3.2. Extracción de ADN .....	17
3.3.3. PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) .....	17

3.4 Data clínica .....	18
3.5 Análisis de resultados .....	18
3.5.1. Individuos para análisis de densidades de incidencia .....	19
3.5.2. Análisis Estadístico .....	20
3.5.3. Aspectos Éticos .....	22
<b>CAPITULO IV: RESULTADOS .....</b>	<b>23</b>
4.1 Población de Estudio .....	23
4.2 Muestreos de la población durante los 4 barridos .....	25
4.3 Densidad de Incidencia en evolución de subpatentes .....	26
4.4 Características sociodemográficas asociadas a la evolución de infecciones subpatentes..	27
<b>CAPITULO V: DISCUSIÓN.....</b>	<b>29</b>
<b>CAPITULO VI: CONCLUSIONES .....</b>	<b>35</b>
<b>CAPITULO VII: RECOMENDACIONES Y LIMITACIONES .....</b>	<b>36</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>38</b>
<b>CAPITULO IX: ANEXOS.....</b>	<b>44</b>

# ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

## Índice de Tablas

Tabla 1: Distribución por etapas de vida de los casos de malaria, Perú 2016. Fuente: Ministerio de Salud – Dirección General de Epidemiología .....	9
Tabla 2: Estimación de poder de prueba de la conversión de Subpatente a Patente .....	22
Tabla 3: Características sociodemográficas y epidemiológicas de la población de Estudio en 4 comunidades del distrito de Mazán (N=529).....	24
Tabla 4: Características epidemiológicas de malaria del muestreo total de la población de Estudio en 4 comunidades del distrito de Mazán a lo largo de los cuatro barrios del Estudio (N=1730) ...	26
Tabla 5: Incidencia de cambios de detectabilidad de individuos con infecciones subpatentes para <i>P. vivax</i> durante los 4 barrios DAC (N=529) .....	27
Tabla 6: Razón de densidades para viraje de subpatente para <i>P. vivax</i> a patente y de subpatente a indetectable versus cuatro características sociodemográficas .....	28

## Índice de Figuras

Figura 1: Casos de Malaria en el Perú (1986-2016). Fuente: Ministerio de Salud – Dirección General de Epidemiología.....	1
Figura 2: Ciclo infeccioso de malaria en el vector y el hospedero. Fuente: Center for Disease Control and Prevention (CDC).....	4
Figura 3: Mapa geográfico de las 4 comunidades de Mazán. GC: Gamitana Cocha; LI: Libertad; PE: Primero de Enero; UM: Urco Miraflores (48) .....	16
Figura 4: Diagrama de flujo para selección de individuos asociados a cambios de tipo infección de <i>P. vivax</i> .....	20

## RESUMEN

**Introducción:** *Plasmodium vivax*, el parásito causante de la mayoría de casos de malaria en la Amazonía peruana, suele ser indetectable a microscopía (infecciones subpatentes). La estrategia de detección activa de casos (DAC) desestima a las infecciones subpatentes cuando esta emplea microscopía. Este estudio busca determinar los patrones de detectabilidad que siguen las infecciones subpatentes en una estrategia de DAC. **Materiales y Métodos:** Se registró la data clínica y sociodemográfica de 4 comunidades del distrito de Mazán, se colectó múltiples muestras de sangre por individuo y se realizó el diagnóstico de malaria por qPCR. Se determinó la densidad de incidencia (DI) de la conversión de infecciones subpatentes en volverse indetectable (a PCR y microscopía) y volverse patente. Además, se buscó asociación con características sociodemográficas calculando razones de densidades de incidencia (RDI) mediante Regresión de Poisson. **Resultados:** La proporción de infecciones subpatentes de *P. vivax* superó a la proporción patente. La DI de infecciones subpatentes de *P. vivax* que se vuelven indetectables fue de 62.59 y de volverse patente fue de 20.15 por cada 100 personas-semana. La regresión de Poisson obtuvo asociaciones no significativas. **Conclusión:** Las infecciones subpatentes de *P. vivax* suelen volverse indetectables, y una minoría se vuelven patentes. Sin embargo, se requieren estudios de seguimiento a la población subpatente como la presente tesis que abre camino a posteriores estudios relacionados a la evolución de la detectabilidad de las infecciones subpatentes en la Amazonía.

**PALABRAS CLAVE:** Subpatente, DAC, *Plasmodium vivax*, PCR.

## ABSTRACT

**Introduction:** *Plasmodium vivax*, the parasite that causes the majority of malaria cases in the Peruvian Amazon, is often undetectable under microscopy (subpatent infections). The active case detection (DAC) strategy subestimates subpatent infections when it uses microscopy. This study seeks to determine the patterns of detectability that subpatent infections follow in a DAC strategy. **Materials and Methods:** The clinical and sociodemographic data of 4 communities in Mazán district were analyzed, multiple blood samples were collected per individual and malaria diagnosis was made using qPCR. Incidence densities (ID) for the conversion from subpatent infections to negative (to PCR and microscopy) and to patent infection were determined. In addition, associations with sociodemographic characteristics was sought calculating incidence density ratios (IDR) using Poisson Regression. **Results:** The proportion of *P. vivax* sub-patent infections exceeded considerably to the patent proportion. The ID of conversion from subpatent infections by *P. vivax* to negative was 62.59 and to patent infection was 20.15 per 100 persons-week. Poisson regression yielded non-significant associations. **Conclusion:** Subpatent infections by *P. vivax* tend to become negative, and a minority becomes patent. However, follow-up studies of the sub-patent population are required, such as the present thesis, which opens the way for further studies related to the evolution of the detectability of sub-patent infections in the Amazon.

**KEY WORDS:** Subpatent, DAC, *Plasmodium vivax*, PCR.

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 ANTECEDENTES

**1.1.1 Epidemiología de la Malaria.** La malaria o paludismo es una enfermedad tropical ocasionada por el parásito *Plasmodium spp*, se presenta con mayor prevalencia en los países ubicados entre los trópicos y su principal vector en el área Neotropical es el mosquito *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* (1). Se calcula que hubieron alrededor de 214 millones de casos de malaria en el año 2015 y causaron la muerte de 438 mil personas a nivel mundial (2). En el Perú, el número de casos de Malaria se incrementó de 60657 casos anuales en 1992 hasta 243856 casos anuales en 1998. Luego se redujo al año 2000 con 56957 casos e incrementó progresivamente al año 2005 con 87667 casos como muestra la Figura 1.

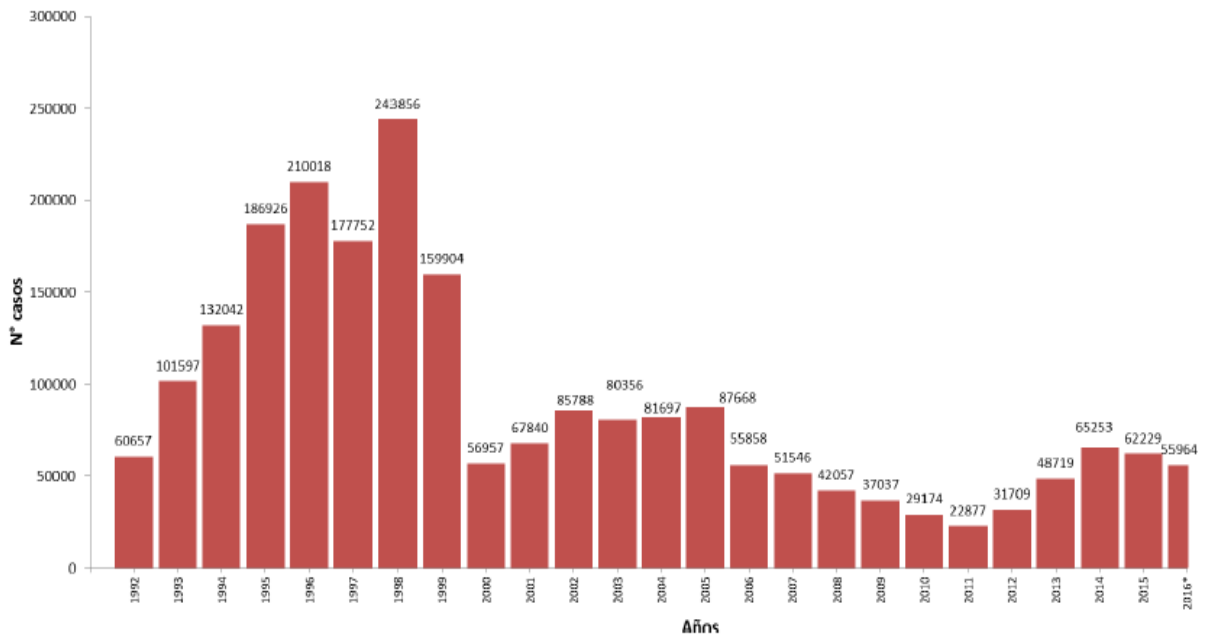


Figura 1: Casos de Malaria en el Perú (1986-2016). Fuente: Ministerio de Salud – Dirección General de Epidemiología

Este número de casos fue en descenso paulatino hasta el año 2011, descendiendo hasta la cifra de 22877 casos. Luego de este descenso se incrementó el número de casos progresivamente hasta el 2015 con 62229 casos (3). Cerca del 90% del total casos de malaria en el Perú se ubican en la Amazonía y se focalizan principalmente en el departamento de Loreto, siendo causados por las especies *P. falciparum* (15% a 20% del total de casos) y *P. vivax* (80% a 85% del total de casos) (3).

**1.1.2 Malaria en el Loreto.** A inicios de los noventa se reportaban pocos casos de malaria en Loreto, sólo 140 casos de *P. falciparum*. El principal vector de la malaria Neotropical, *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi*, se introduce en la zona de Iquitos, Loreto, durante la década de 1990, donde desplazó a otros anofelinos, siendo esta especie la responsable de una gran epidemia de malaria (4). El número de casos aumentó hasta 54290 por *P. falciparum* y un total de 177752 casos de malaria (*P. falciparum* y *P. vivax*) confirmados por microscopía en 1997 (5). El número de casos de malaria siguió en aumento a más de 240 000 en 1998 (6), este aumento se vinculó también con el crecimiento de la transmisión de *P. falciparum* de 1994 a 1996 en Loreto (1). Luego de la epidemia y las intervenciones para la reducción de malaria en el Perú, el número de casos de malaria disminuyó hasta el año 2000 con cerca de 56 mil casos, este número tuvo un ligero incremento entre los años 2002 a 2005 y disminuyó a cerca de 29 mil casos al año 2010, todos estos detectados por el método de microscopía (2).

Sin embargo, luego de la finalización del proyecto PAMAFRO en el Perú en 2010, los casos de malaria se han incrementado desde 2011 al 2013. siendo Loreto el foco principal con el 94.5 % de casos de malaria en el Perú y en su mayoría por *P. vivax* (8) (9). El incremento del número de casos de malaria continuó hasta el 2014 alcanzando 65253 casos y para el año siguiente el número de casos se redujo ligeramente a 61108 casos y al año 2016 con 54539 casos (7). En la región de Loreto a finales del 2016 se ha denominado con alto riesgo a 17 distritos y con muy alto riesgo a otros 9 distritos (3). Entre estos está el distrito de Mazán, considerado como de alto riesgo para *P. vivax* y mediano riesgo para *P. falciparum* (10).

**1.1.3 Sintomatología de Malaria.** La sintomatología de la malaria en la Amazonía peruana varía dependiendo de la especie de *Plasmodium*, desde cuadros clínicos severos hasta la ausencia de síntomas y signos visibles (pacientes asintomáticos). Los criterios para definir la sintomatología de la enfermedad varían entre autores, sin embargo, la mayoría de estudios considera el estado febril como principal signo clínico para definir la sintomatología palúdica. El criterio para considerar a un individuo febril varía desde temperaturas superiores a 37.5 °C (11) hasta por encima de los 38.3°C (12). Existen otros síntomas menos específicos como dolor de cabeza, dolor corporal y escalofríos que también son considerados en algunos estudios. Tal es el caso del estudio de Pherez y Cunha en Norteamérica que reportó, en el 50% de los pacientes de malaria, presencia de dolores de cabeza como síntoma casi universal en pacientes adultos hospitalizados, y la incidencia este síntoma estuvo relacionado con alta parasitemia (13). En Sudamérica, un estudio de pacientes hospitalizados en una zona endémica de Venezuela reportó que todos los pacientes con malaria presentaron fiebre, anemia y trombocitopenia; el 86% de estos presentó dolor de cabeza, dolor y malestar abdominal; 71% con hepatomegalia y 57% hiporexia y leucopenia (14). Otros síntomas menos descritos tales como ictericia y náuseas fueron reportados como frecuentes en pacientes con malaria en un estudio realizado en la Amazonía brasileña (15).

#### **1.1.4 Ciclo infectivo de la Malaria:**

**Ciclo en el vector:** El mosquito del género *Anopheles* entra en el ciclo infectivo del parásito *Plasmodium* cuando la hembra se alimenta de la sangre de un individuo portador de gametocitos (fase sexual del parásito) de *Plasmodium*. Los gametocitos femeninos y masculinos se desarrollan en la luz del intestino medio del mosquito hasta formar macrogametos y microgametos respectivamente (16). Estos gametos se unen y forman el cigoto, este se desarrolla en un ooquiteno que se transforma en ooquiste para hacer múltiples replicaciones como se muestra en la Figura 2. Del día 10 al día 12 posterior a la

alimentación de la hembra *Anopheles*, los ooquistes cargados de miles de esporozoitos son liberados en el hemocele y 14 días después, luego de viajar por la hemolinfa, se posicionan en las glándulas salivales. La posterior picadura del mosquito inyecta los esporozoitos en el hospedero, completando de este modo el ciclo sexual de *Plasmodium* en el vector (17).

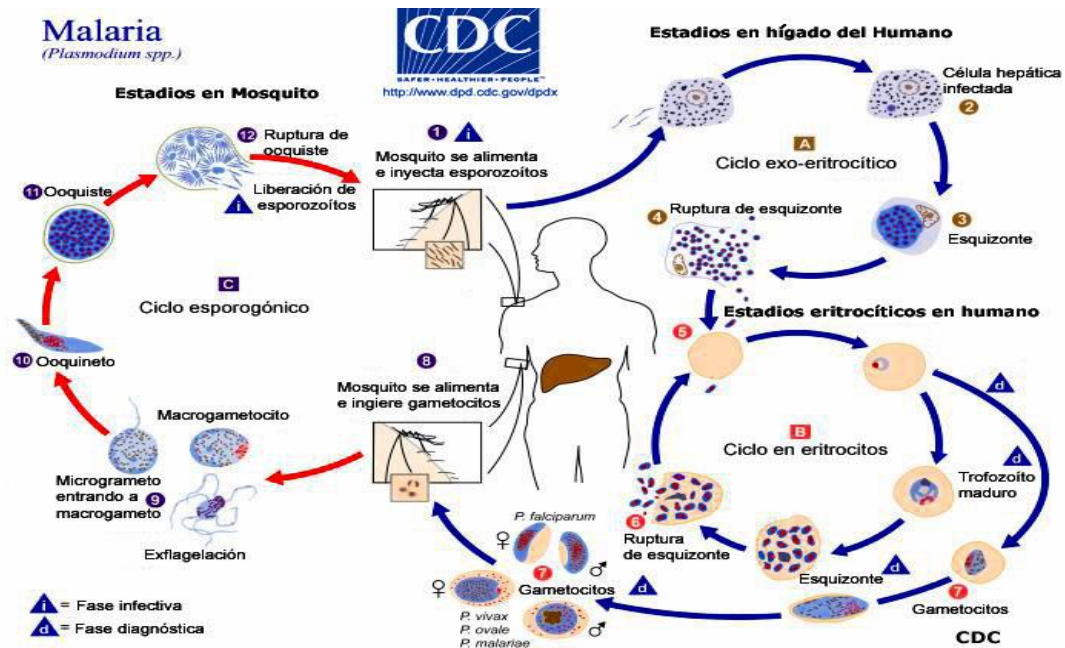


Figura 2: Ciclo infeccioso de malaria en el vector y el hospedero. Fuente: Center for Disease Control and Prevention (CDC)

**Evolución Clínica en el humano:** Luego de la picadura del mosquito, el periodo de incubación puede durar 7 días o más antes que el individuo presente síntomas de la enfermedad. Los esporozoitos viajan por el torrente sanguíneo hasta las células hepáticas, dentro de estas se transforman en merozoítos y se reproducen para salir liberados nuevamente al torrente sanguíneo, esto conocido como ciclo exo-eritrocítico (figura 2). Existe una fase denominada hipnozoíto, que ocurre cuando el parásito entra en un estado de latencia y permanece en la célula hepática sin continuar el ciclo infeccioso (18). Cuando los merozoítos son liberados en la sangre son capaces de invadir a los eritrocitos, y dependerá de las interacciones específicas entre los ligandos de membrana de los merozoítos y los receptores del eritrocito. Además, existen mecanismos de unión de

membrana en *Plasmodium* que actúan en fases preliminares a la invasión como en la fijación y la orientación de los merozoítos (19). A diferencia de *P. falciparum*, en *P. vivax* la invasión se limita a los reticulocitos Duffy-positivos (20). En el eritrocito, los merozoítos invasores se transforman en trofozoítos y se multiplican formando esquizontes, que posteriormente se rompen liberando nuevos merozoítos que invadirán otros eritrocitos y reiniciando el ciclo eritrocitario de *Plasmodium*. En este ciclo eritrocitario, algunos trofozoítos pueden diferenciarse en gametocitos (estadio sexual), siendo estos los que tienen la capacidad de continuar el ciclo infeccioso en el mosquito (21).

Las especies de *Plasmodium* pueden generar cuadros clínicos variados en el ciclo eritrocitario, la forma más grave de malaria es causada por *P. falciparum*. Sus características clínicas pueden incluir fiebre, escalofríos, dolor de cabeza, dolores musculares, vómitos, tos, diarrea y dolor abdominal (18). En la mayoría de casos, el estado febril se puede relacionar con malaria luego de 7 días después de la picadura del vector y hasta 3 meses después de la última posible exposición (en casos muy raros). La malaria ocasionada por *P. falciparum* puede ser fatal si el tratamiento se retrasa más de 24 horas posterior al inicio de la aparición de síntomas. Las especies *P. vivax* y *P. ovale* son capaces de permanecer latentes en el hígado en forma de hipnozoítos, capaces de causar recaídas luego de meses o raramente varios años posterior a la infección inicial (22).

**1.1.5 Métodos de detección de Malaria en la Amazonía.** En la actualidad existen diversos métodos para la detección de malaria, el más convencional es el método de microscopía en muestras laminares de sangre para detectar presencia y densidad parasitaria.

La sensibilidad del método de microscopía puede depender según sus variantes metodológicas y el escenario donde se aplique. Un estudio que comprende el diagnóstico de malaria mediante microscopía por parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS), revela que el límite de detección de dicha técnica es de 88 parásitos /  $\mu\text{L}$  de sangre (23). Otro estudio revela que el umbral inferior de detección de la microscopía va desde 10-20 parásitos /  $\mu\text{L}$  en el ámbito de investigación, y este puede ascender hasta más de 100 /  $\mu\text{L}$

si se trata de un escenario clínico (24). Los Frotis gruesos son 20-40 veces más sensibles que los frotis finos para la detección de *Plasmodium*, con un límite de detección de 10-50 parásitos /  $\mu\text{L}$ . Además, los frotis finos son empleados para la identificación de especies de malaria, infecciones mixtas, cuantificar parasitemia por volumen de sangre, y determinar la presencia de estadíos como esquizontes, gametocitos, y pigmento malárico en neutrófilos y monocitos (25). La parasitemia por volumen de sangre se determina comúnmente partir del número de parásitos por número de glóbulos blancos, suponiendo una cantidad fija de glóbulos blancos /  $\mu\text{L}$  de sangre (26).

Sin embargo, las parasitemias causadas por *P. vivax* pueden estar por debajo del umbral de detección microscópica, y se han presentado de forma frecuente en zonas que están en vías hacia la eliminación de la malaria, lo cual conlleva a que su diagnóstico sea particularmente difícil retrasando el propósito de eliminación (27). A este tipo de infecciones con parasitemia inferior al umbral de detección microscópica se les denomina infecciones submicroscópicas o subpatentes, y debido a que se pueden presentar este tipo de infecciones, han surgido métodos de detección alternativos como el que emplea la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, *por sus siglas en inglés*).

Métodos basados en PCR han demostrado ser aproximadamente 10 veces más sensibles que la microscopía. Existen variantes moleculares de estos métodos capaces de detectar densidades parasitarias menores 10 parásitos /  $\mu\text{L}$  (28,29). Entre estas, la técnica de PCR de Snounou, por su sensibilidad, tiene la capacidad de detectar hasta 5 parásitos /  $\mu\text{L}$  de sangre (30).

Se han usado blancos moleculares como la subunidad pequeña rRNA 18S y genes circunsporozoitos (CS) para la diferenciación de *Plasmodium spp.* Los métodos que utilizan PCR anidado y la transcripción inversa por PCR son capaces incluso de identificar hasta 4 especies de *Plasmodium* en un solo procedimiento (31). El método de diagnóstico que usa este estudio es el protocolo de PCR descrito por Mangold y colaboradores mediante qPCR (PCR cuantitativo a tiempo real), que amplifica el gen multicopia 18S rRNA. La sensibilidad

de este método, empleando el rango referencial de 4,7- 6,1 millones de eritrocitos / mL de sangre, sería equivalente a 470-1220 parásitos / mL, o aproximadamente 1 parásito /  $\mu$ L de sangre (32).

El estudio de Andrade y colaboradores, realizado en la Amazonía brasileña, demuestra la ventaja del PCR sobre otros métodos para el diagnóstico de malaria. Ese estudio obtuvo que el método de PCR detectó el mayor número de casos y presentó mayor especificidad frente a las pruebas de diagnóstico rápido (RDTs, *por sus siglas en inglés*) y a la microscopía para el diagnóstico de portadores sintomáticos y asintomáticos de malaria. El tipo de PCR usado en dicho estudio fue PCR anidado, y detectó un total de 107 individuos infectados exclusivamente con *P. vivax* (61,84% de los casos positivos), 53 individuos infectados exclusivamente con *P. falciparum* (30,63% de los casos positivos) y 13 casos de infección mixta (*P. vivax* + *P. falciparum*; 7,51% de los casos positivos) siendo el dicho método diagnóstico el Estándar “de oro”. La microscopía sólo detectó 84 casos de malaria vivax mientras que el RDT detectó 56 casos de malaria por *P. falciparum* y 98 casos de malaria por *P. vivax*, aunque este no pudo discriminar infecciones mixtas (33).

El mayor número de infecciones capaces de ser detectadas por PCR y no por microscopía deja entrever a un grupo de portadores de malaria, no detectados ni tratados por el Programa Nacional de Malaria del Ministerio de Salud, que emplea la microscopía en la mayoría de casos. Este grupo representaría un reservorio de la enfermedad y que podría mantener permanente la transmisión de la enfermedad. Bajo este panorama se tiene a una considerable proporción de la población con alto potencial para mantener la transmisión de malaria en la Amazonía, debido a que hay un subgrupo grande de asintomáticos además de ser subpatentes (34). Por ello los pacientes con infección subpatente son difíciles de detectar, por ser menos propensos a presentar síntomas de malaria, y esto a causa de la relación positiva entre presencia de síntomas y carga parasitaria, como detalla el estudio de Da Silva-Nunez y Ferreira en el estado de Acre, al noreste de Brasil, que encontró una correlación positiva de la carga parasitaria de malaria con la prevalencia, la intensidad percibida de la fiebre y otros síntomas clínicos (35). El estudio de Roshanravan y

colaboradores, realizado en la Amazonía peruana, halló 13 individuos con *P. falciparum* y 30 con *P. vivax* por microscopía de donde sólo 8 y 19, respectivamente, presentaban fiebre, infiriendo que existía un alto porcentaje de infecciones de baja densidad parasitaria que eran asintomáticas (11). Resultados similares fueron reportados en un estudio que encuentra correlación entre el estado febril y la densidad parasitaria, donde el 41% y el 24% de infectados con *P. falciparum* y *P. vivax* respectivamente fueron asociadas con estado febril, por lo que se considera a este como indicador principal de sintomatología de la enfermedad, también presentaron dolor corporal y dolor de cabeza, aunque con porcentajes menores al 10% (12).

**1.1.6 Infecciones subpatentes en la Amazonía.** El diagnóstico por métodos moleculares aún no abarca a las zonas más afectadas por la malaria en el Perú. En 1999, estudio de Roshanravan y colaboradores en las comunidades aledañas a la provincia de Iquitos reportaron que aproximadamente 2/3 de las infecciones eran subpatentes. De estos últimos, los 3/4 de infecciones subpatentes fueron asintomáticas, lo cual sugirió una asociación entre infecciones subpatentes y la ausencia de síntomas (11). Para el caso de *P. falciparum*, en promedio, una revisión de casos documentados revela cerca del 50,8% de prevalencia detectada por microscopía en relación a los positivos por PCR, siendo más común en adultos, en las zonas de baja transmisión y en las infecciones crónicas (36). Se estima que estas infecciones subpatentes de *P. falciparum* contribuyen entre el 20% y el 50% de transmisión de humano a mosquitos en áreas de baja y muy baja transmisión respectivamente (37).

En la Amazonía brasileña, un estudio longitudinal indicó una alta prevalencia de infecciones asintomáticas de *P. falciparum* y *P. vivax*. Además, hallaron que las infecciones asintomáticas eran de 4 a 5 veces más altas que las sintomáticas (38). Otro estudio de la misma región amazónica, en Remansinho, indicó que infecciones de baja parasitemia y asintomáticas ocasionadas por *P. vivax* pueden complicar la eliminación de la malaria residual (39). Además, se sugiere que los pacientes asintomáticos de malaria formarían la

base para continuar la endemidad de la malaria en la región y albergar un depósito persistente de reinfección continua dentro de la región amazónica del Perú (11).

**1.1.7 Factores que contribuyen a la aparición de infecciones subpatentes de *P. vivax*:** Entre los diversos factores que pueden estar involucrados se incluye principalmente la presencia de anticuerpos desarrollados contra el parásito y su respuesta inmunitaria en infecciones posteriores. Un estudio de cohorte transversal en Brasil revela que individuos con infecciones subpatentes son 2,45 veces más propensos a tener anticuerpos anti-Pvmsp1, proteína de superficie de merozoítos-I de *Plasmodium vivax*, que individuos indetectables al PCR (40,41). Resultados concordantes obtuvo el estudio realizado en Piura, Perú, que encontró que la positividad de PCR se asoció significativamente con la presencia de anticuerpos anti-Pvmsp1 (42).

El segundo factor que contribuye a la aparición de infecciones subpatentes es la edad. Es común que, en las zonas endémicas de malaria, la población adolescente tenga parasitemia más bajas que la que tienen los niños, aparentemente debido a la inmunidad que se desarrolla luego de infecciones recurrentes. Dado esto, el mayor porcentaje de casos de malaria de *P. vivax* y *P. falciparum* se encuentra representado por el grupo etario de menor edad, como muestra en la Tabla 1. Además, la revisión de Cheng y colaboradores encontró en cinco publicaciones que la proporción relativa de infecciones subpatentes de *P. vivax* aumenta con la edad (27).

**Tabla 1: Distribución por etapas de vida de los casos de malaria, Perú 2016. Fuente: Ministerio de Salud – Dirección General de Epidemiología**

Etapas de vida (años)	2016		
	Casos	Pob	TIA/ 100 000 Hab
Niñez (0-11 a)	24529	6922109	354.4
Adolescentes (12-17 a)	7851	3482162	225.5
Juventud (18-29 a)	9517	6676249	142.6
Adultos (30-59 a)	11999	11289493	106.3
Adultos mayores (60+a)	2068	3118612	66.3
	55964	31488625	177.7

(a)= años.

La diferencia en calidad de los métodos de Microscopía y PCR se basa en aspectos técnicos, pero relevantes en la detección de población con infección subpatente de malaria. La mayoría de los estudios describen a los microscopistas como expertos, con experiencia, altamente especializados o bien entrenados, sin embargo, no siempre proporcionan información sobre sus calificaciones (27). Pocos estudios como el de Harris y colaboradores, declara los niveles de competencia de los microscopistas según la evaluación de competencias acreditado por la OMS para la detección de malaria por microscopía (43).

En otros aspectos, el tratamiento contra la malaria también podría afectar la densidad de parásitos en el momento de la evaluación y aumentar la prevalencia de infecciones subpatentes de *P. vivax*. Un estudio informó que el tratamiento antimalárico reciente menor a las 4 semanas antes de la encuesta se asoció con un aumento significativo en el riesgo de tener infecciones subpatentes de *P. vivax* (44) y esto probablemente debido al descenso de densidad parasitaria en sangre post tratamiento.

**1.1.8 Recaídas y evolución de las infecciones subpatentes:** La evolución de los síntomas post tratamiento puede reducirse a pocos días. En Padre Cocha, una comunidad de la Amazonía peruana, se evaluó a los pacientes patentes posterior al tratamiento de la enfermedad y se halló que la duración media de los síntomas fue de 2 días (45). Sin embargo, posterior al tratamiento es posible que algunas infecciones recurrentes de *P. falciparum* no se manifiesten hasta después de los 30 días de la desaparición de síntomas originados por la infección inicial (5). Pero esto es desde la detección por microscopía dado que un seguimiento por PCR podría dar una visión más clara de la evolución de estas infecciones. Por otro lado, el proceso que sigue *P. vivax* es más complejo debido que tiene otras características que hacen más difícil su eliminación. Una de las características más importantes de las infecciones de *P. vivax*, además de la alta prevalencia de infecciones con parasitemias subpatentes, es la capacidad de persistir en el huésped humano durante varios meses como hipnozoíto, fase del parásito alojado en el hígado de forma latente capaz de causar recaídas (22).

Las recaídas ocasionadas por infecciones tropicales de *P. vivax* suelen ocurrir posterior a las 3 semanas de ser aparentemente eliminadas, mientras que en las regiones templadas y partes de las zonas subtropicales, las infecciones por *P. vivax* se caracterizan por una larga incubación o un largo período de latencia entre la enfermedad y la recaída, que en ambos casos se aproxima un periodo de 8-10 meses, lapso de tiempo que podría estar asociado al estado subpatente de la infección (22). Los intervalos entre las recaídas *P. vivax* muestran una periodicidad aún no determinada, pero que podría explicar las altas tasas de *P. vivax* y la alta proporción de genotipos heterólogos en las recaídas, y que al facilitar la recombinación entre los diferentes genotipos, contribuye a la mayor diversidad genética de *P. vivax* especialmente en entornos de baja transmisión (22).

**1.1.9 Detección Activa de Casos.** En el contexto de una mayor población asintomática a la esperada, la detección pasiva de casos (DPC), cuya acción se basa en esperar a la llegada de pacientes al centro de salud para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad mediante microscopía, pasó a ser una medida cuestionable para el manejo de la malaria en la Amazonía. La mayor desventaja de la DPC es su incapacidad para detectar individuos con infecciones asintomáticas que no buscan atención médica (46). En tal sentido, la detección activa de casos (DAC) se presenta como una alternativa que la OMS ha recomendado para superar estas desventajas (47), aunque no resuelve necesariamente la desestimación de la población subpatente. La DAC consiste en acudir directamente a la población, diagnosticarlas con microscopía y brindar tratamiento a los portadores detectados independientemente de la presencia de síntomas, de este modo podría significar un enfoque más eficaz con miras hacia la eliminación de la malaria en la región amazónica.

Actualmente en la Amazonía peruana, la vigilancia de la malaria se realiza a través de DPC, a pesar que estudios como el de OraLee Branch y colaboradores en Iquitos, obtuvieron que la prevalencia de *P. falciparum* y *P. vivax* determinada mediante estrategias de detección activa + pasiva era 4,33 veces y 1,77 veces mayor, respectivamente, que la prevalencia estimada usando sólo la detección pasiva en los puestos de salud (12). Estos datos sugirieron que la detección activa de casos estaría más acorde para ser aplicado un escenario como el

de la Amazonía peruana donde hay una gran proporción de infecciones subpatentes y sobre todo asintomáticas.

Este estudio toma los datos de diagnóstico y la información sociodemográfica de un proyecto matriz llamado “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” [SIDISI: 0000064371] que emplea la estrategia de DAC con el propósito de registrar el comportamiento de las infecciones subpatentes y desarrollo de la enfermedad en toda la comunidad logrando captar información de la población asintomática y de la población subpatente. El empleo exclusivo de microscopía en las DAC y DPC deja pacientes subpatentes desestimados, por lo que este estudio añade el diagnóstico a través de la técnica molecular de PCR. Sin embargo, la importancia no solo radica en estimar a los pacientes subpatentes sino también conocer el comportamiento que siguen este tipo de infecciones, el desarrollo de la enfermedad en estos pacientes y la capacidad de ser detectados por el método de microscopía o de eliminar la enfermedad en el transcurso de un tiempo determinado.

## **1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Se sabe que en la Amazonía peruana existe una alta prevalencia de infecciones subpatentes de *Plasmodium*, y en mayor proporción de *P. vivax*, las cuales no son detectadas ni tratadas por el MINSA, debido al método de detección que emplea. Pero se desconoce el patrón de comportamiento de estas infecciones en el intervalo de tiempo de una estrategia de control como la DAC, es decir, se desconoce cuántas de estas infecciones subpatentes pasan a volverse indetectables o alcanzan volverse patentes. Las características epidemiológicas y sociodemográficas, así como los recursos de la Amazonía peruana pueden variar según la comunidad y se desconoce si estas características puedan estar asociadas con la evolución que sigan estas infecciones subpatentes.

## **1.3 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**

Este estudio busca obtener información de la población de portadores de malaria en el distrito de Mazán, Provincia de Maynas, Loreto, y determinar la evolución de la detectabilidad en infecciones subpatentes de *P. vivax* durante el tiempo empleado de una estrategia de control. Esto es de suma importancia para conocer si el intervalo de tiempo de esta estrategia de control es suficiente para que los subpatentes logren evolucionar hasta ser infecciones detectables por microscopía y así tener acceso al tratamiento que brinda el MINSA. Actualmente existen pocos estudios que hagan un seguimiento de la detectabilidad de las infecciones subpatentes en esta zona y esto es de vital importancia para determinar la verdadera la peligrosidad del reservorio subpatente. A su vez determinar una posible asociación de la evolución subpatente y otras características sociodemográficas de las comunidades de Mazán daría una visión más amplia del mapa epidemiológico para combatir eficazmente la malaria en la Amazonía peruana.

## CAPÍTULO II

### HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 2.1 HIPÓTESIS

Existe una asociación entre la evolución de la detectabilidad que siguen las infecciones subpatentes de *P. vivax* con el grupo etario y otras características sociodemográficas en el distrito de Mazán de la Amazonía peruana.

#### 2.2 OBJETIVOS

##### 2.2.1 Objetivo General:

- Determinar la incidencia de cambio en el tipo de infección de los individuos subpatentes portadores de *P. vivax* y su posible asociación con el grupo etario y otras características sociodemográficas y epidemiológicas en cuatro comunidades del distrito de Mazán de la Amazonía peruana.

##### 2.2.1 Objetivos Específicos:

- Estimar la presencia y tipo de infección (subpatente o patente) determinado por PCR y microscopía en pacientes portadores de *P. vivax* y *P. falciparum* en 4 comunidades endémicas del distrito de Mazán durante las intervenciones DAC.
- Determinar la incidencia en volverse indetectables de las infecciones subpatentes por *P. vivax* en estas comunidades.
- Determinar la incidencia de volverse patentes de las infecciones subpatentes por *P. vivax* en estas comunidades.
- Determinar la asociación entre conversión de las infecciones subpatentes de *P. vivax*, con el grupo etario y otras características epidemiológicas y sociodemográficas.

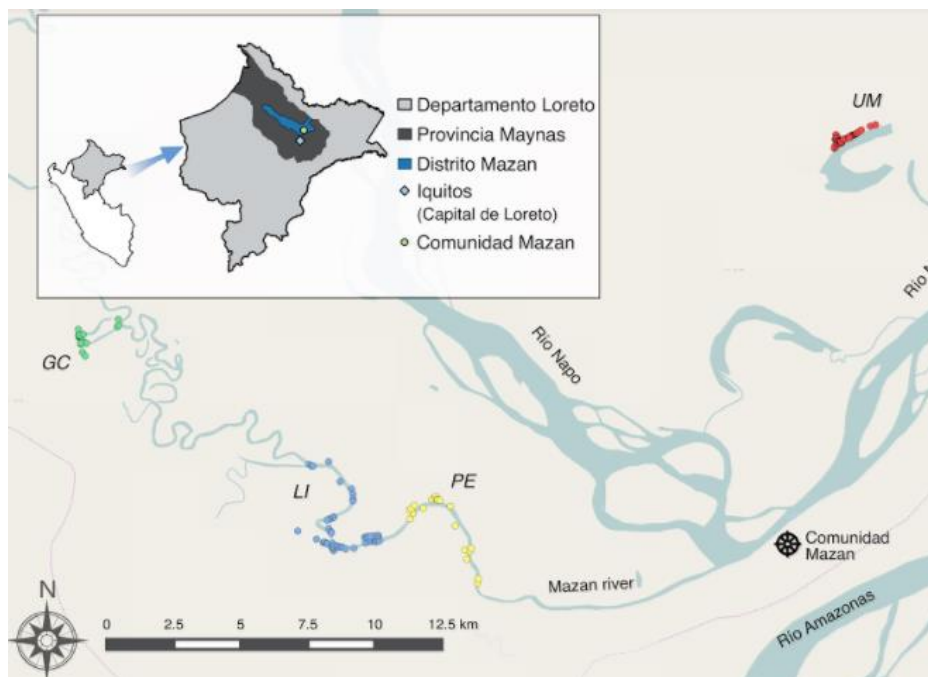
## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Diseño de Estudio

Este estudio parte de un estudio matriz llamado “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” [SIDISI: 0000064371] concluido en marzo del 2015 a cargo del Grupo de Investigación en Malaria del Instituto de Medicina Tropical “Alexander von Humboldt”, de donde se tomaron las muestras obtenidas para el presente estudio. El trabajo de recolección de muestras en campo se realizó en el distrito de Mazán, provincia de Maynas del departamento de Loreto. Mazán es considerado distrito de alto riesgo para la transmisión de malaria hasta la fecha.

El estudio se llevó a cabo en 4 de las comunidades donde se había reportado un incremento inusual de casos determinado por la Dirección regional de Salud Loreto (DRSL): Gamitana Cocha, Primero de Enero, Libertad y Urco Miraño. Estas comunidades se encuentran aledañas al río Mazán y al río Napo, en donde Urco Miraño se encuentra un poco más alejado de las otras 3 comunidades (Figura 3). Los individuos enrolados en el estudio fueron aquellos que se encontraban en sus hogares al momento de las DAC, que hayan comprendido y firmado el documento de consentimiento para la investigación. La población captada fue de 833 individuos en total. La estrategia de DAC aplicada en este proyecto consistió en la ejecución de cuatro 4 DAC consecutivas, con intervalos de 7 a 10 días. En estas DAC se realizó microscopía diagnóstica con la toma de una muestra adicional de sangre en papel filtro para su procesamiento posterior por PCR para la detección de parásitos de *Plasmodium spp.* Estos datos permitieron identificar el tipo de infecciones y el tipo de evolución que sigue la infección respecto a su detectabilidad por ambos métodos de diagnóstico en el tiempo de los barridos de las DAC. También se buscó determinar si la evolución de las infecciones subpatentes guardaba relación con las características sociodemográficas como el grupo etario.



**Figura 3: Mapa geográfico de las 4 comunidades de Mazán. GC: Gamitana Cocha; LI: Libertad; PE: Primero de Enero; UM: Urco Miraño (48)**

### 3.2 Toma de muestras

Se tomó muestras de los individuos de todas las viviendas de 4 comunidades del distrito de Mazán: Gamitana Cocha, Libertad, Urco Miraño y Primero de Enero. Se obtuvieron muestras de sangre capilar mediante punción digital recolectando aproximadamente 10 gotas de sangre (equivalente a 0.5 ml), de las cuales 2 gotas (0.1 ml) se destinó para preparar la prueba de gota gruesa y el frotis para el diagnóstico por microscopía de malaria en el distrito de Mazán. Cuatro gotas de sangre (0.2 ml) fueron recogidas en papel filtro para extracción de ADN y el posterior diagnóstico por PCR en tiempo real (qPCR) en el Laboratorio de malaria ubicado en los Laboratorios de Investigación y Desarrollo – LID, Universidad Peruana Cayetano Heredia. Se registraron los signos, síntomas y datos sociodemográficos de los habitantes de la comunidad en una ficha clínica epidemiológica. Posteriormente, todas las viviendas de la comunidad fueron visitadas en forma sucesiva con intervalos de 7-10 días hasta completar 4 visitas (4 DAC) en total, aplicándose las encuestas

individuales de síntomas a cada miembro de familia donde se procedió a realizar la toma de sangre capilar para la microscopía inmediata, y para el posterior análisis con qPCR correspondiente a cada barrido.

### 3.3 Procedimientos de laboratorio

**3.3.1 Microscopía:** Las láminas con la gota gruesa (GG) y frotis fueron coloreados con Giemsa al 10% por 10 minutos y examinados para determinar la densidad parasitaria mediante el conteo del número de parásitos por 200 leucocitos (L) y asumiendo 8,000 L /  $\mu$ l. Para los resultados de este estudio solo se consideró presencia del parásito.

**3.3.2 Extracción de ADN:** Se extrajo el DNA genómico de las muestras en papel filtro usando el kit comercial E.Z.N.A.<sup>®</sup> Blood DNA Kit (Omega Bio-tek<sup>®</sup>, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante (anexo 1), la elución final del DNA fue en un volumen de 50  $\mu$ L.

**3.3.3 PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR):** Se realizó con el fin de determinar presencia, especie y carga de parásitos de *Plasmodium* de las muestras de DNA extraído a partir de sangre en papel filtro. El DNA fue amplificado utilizando la región multicopia 18SrRNA (48), elegido por sus regiones altamente conservadas y encontrarse disperso en cromosomas separados del genoma de *Plasmodium* siguiendo el protocolo de qPCR descrito por Mangold (32) (anexo 2). Este protocolo permite la detección de 4 especies de *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, y *P. malariae*) en una sola reacción de amplificación y mediante el análisis de curva de fusión ( $T_m$ , temperatura melting). Las regiones amplificadas varían en tamaño y conformación según la especie, por ello estas secuencias amplificadas presentan una  $T_m$  distinta para cada especie. Para el análisis de las  $T_m$  de se usó SYBR Green para la detección en el equipo de Real-Time PCR CFX Connect<sup>™</sup> Bio-Rad y uso del programa CFX Maager<sup>™</sup>. Los cebadores empleados fueron Forward: 5-

TAACGAACGAGATCTTAA-3 y Reverse: 5-GTTCCTCTAAGAAGCTTT-3. Se empleó controles positivos de amplificaciones de 18SrRNA de *P. falciparum* y *P. vivax* y se cuantificó la carga en base al número de copias amplificadas. Las condiciones del qPCR consistieron en una desnaturalización inicial a 95 ° C durante 2 min, seguida de una amplificación durante 45 ciclos de 20 s a 95°C, 20 s a 52°C y 30 s a 68°C, con una extensión final de 68°C por 3 min. La amplificación fue seguida inmediatamente una denaturación de 10 s a 95°C, y un aumento gradual de la temperatura de 0,5°C cada 5 s desde 60°C hasta 90°C, seguido de enfriamiento final de 25°C por un minuto (anexo 2).

### **3.4 Data clínica**

Incluye datos sociodemográficos, sintomatología y resultados de diagnóstico de todos los individuos de las 4 comunidades de Mazán en el periodo del estudio. Se considera como patentes a los positivos a malaria por el método de microscopía y subpatentes a los positivos a malaria por qPCR pero negativos a la prueba de microscopía. Los participantes fueron clasificados en 3 grupos etarios a fin de compararlos con estudios epidemiológicos previos en la discusión y por estar relacionados a cambios de etapas de vida (infancia, etapa estudiantil y etapa trabajadora), por lo que estos fueron: de 0 a 5 años, de 5 a 15 años y mayores de 15 años.

### **3.5 Análisis de resultados:**

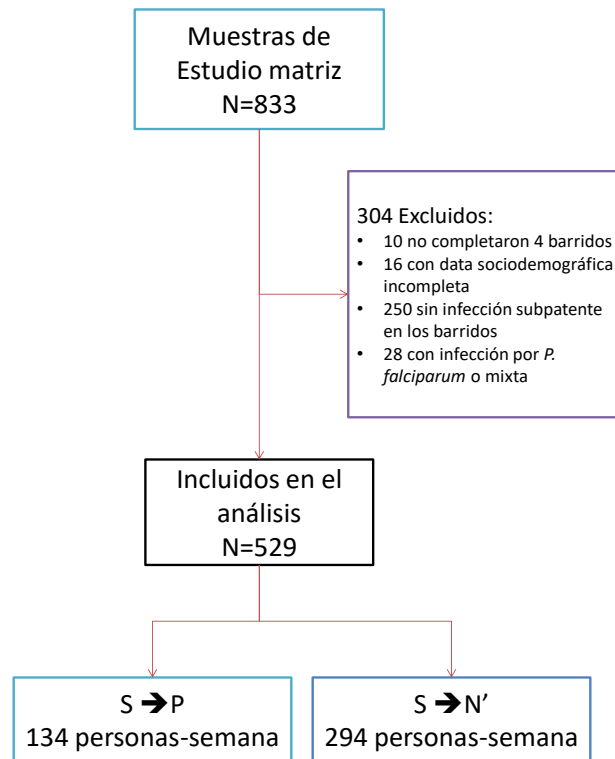
Se calculó las prevalencias determinadas por ambos métodos de diagnóstico, tipo de infección y características sociodemográficas dentro de las 4 comunidades estudiadas. No se calculó un tamaño muestral requerido dado que se usaron los datos completos de las comunidades y se trata de un análisis de datos secundarios, pero sí se realizó un cálculo de potencia de prueba detallado en la sección de análisis estadístico. En las tablas descriptivas

y de análisis se clasificaron los tipos de infecciones según su detectabilidad por microscopía y/o qPCR, y las definiciones a operar fueron las siguientes:

- Infección por malaria: todo individuo con microscopía y/o qPCR positivo independiente de la presencia de síntomas.
- Infección subpatente: infección por malaria detectada con qPCR, pero resultado negativo a microscopía, abreviada con la letra (S).
- Infección patente: infección por malaria detectada con qPCR y positivo a microscopía, abreviada con la letra (P).
- Indetectable: individuo con resultado negativo al diagnóstico por qPCR y negativo a microscopía, abreviada con la letra (N').

**3.5.1. Individuos para análisis de densidad de incidencia:** Se seleccionó a aquellos individuos con la data sociodemográfica completa y que hayan tenido al menos una vez infección subpatente por *P. vivax*. Los datos de tipo de infección se clasificaron para cada barrido de la DAC para elaborar una tabla de presencia, tipo de infección. Se determinó la densidad de incidencia para los individuos subpatentes durante los 4 barridos establecido por persona-tiempo (semana) (Figura 4), considerando estos 2 posibles escenarios de cambio:

- Se vuelven Patentes: Individuos que empezaron siendo subpatentes y en alguno de los posteriores barridos se detectaron como patentes:  $S \rightarrow P$
- Se vuelven indetectables: Individuos que empezaron siendo subpatentes y en pasaron a tener resultados negativos a ambas pruebas de diagnóstico:  $S \rightarrow N'$



**Figura 4: Diagrama de flujo para selección de individuos asociados a cambios de tipo infección de *P. vivax***

S= Infección subpatente: PCR(+) y GG(-)  
 P= Infección Patente: PCR(+) y GG(+)  
 N'= Indetectable: PCR(-) y GG(-)

**3.5.3. Análisis estadístico:** Se evaluó las asociaciones del tipo de evolución que seguían las infecciones subpatentes con las características sociodemográficas por separado empleando regresión de Poisson. Para la clasificación de la data se empleó el Programa Libre R (49) y para el análisis estadístico se usó el programa Stata 12. Se hizo el análisis de la evolución de subpatentes mediante densidad de incidencia. La densidad o tasa de incidencia se obtiene en el cociente del número de nuevos eventos entre el total de personas-tiempo en riesgo (50). Para el presente estudio se determinó la densidad de incidencia como conversiones por persona-semana y se calculó dicho indicador para conversiones de infecciones subpatentes a patentes y de infecciones subpatentes a indetectables.

●**Análisis bivariado:** El análisis de los factores asociados con la conversión de subpatentes se realizó empleando la regresión de Poisson. La razón de densidades de incidencia (RDI) se calculó a partir del cociente entre la densidad de incidencia de conversión de los expuestos a la variable sociodemográfica y la densidad de incidencia de conversión de los no expuestos a dicha variable.

●**Regresión de Poisson:** Esta regresión permite la estimación de RDI ajustadas en modelos multivariados (51). Este tipo de regresión supone que la variable respuesta tiene una distribución de Poisson, además que la variable dependiente no está dispersa en exceso y no tiene número excesivo de ceros.

La razón de densidades de incidencia (RDI) expresa el cambio pronosticado en la densidad de incidencia por una unidad de aumento en la variable predictora. Un RDI mayor a 1 indica que, si la variable predictora aumentara en una unidad, se esperaría que la densidad de incidencia de la variable respuesta cambie por un factor equivalente al arrojado por la RDI, mientras se mantenga las demás variables constantes en el modelo (52). Si la variable predictora es binaria y se codifica como 0 (cero) para los no expuestos y 1 para los expuestos, entonces el RDI mostrará cuánta más incidencia tienen los expuestos con respecto a los no expuestos.

●**Poder de Prueba:** Siendo un análisis secundario de datos no corresponde el cálculo de tamaño de muestra, pero si un análisis del poder estadístico del estudio, el cual se muestra en la Tabla 2. En este análisis se usó como referencia la densidad de incidencia de no expuestos a los mayores de 15 años, y como expuestos a los menores de 5, de acuerdo a la hipótesis del estudio. Con el tamaño de muestra disponible, se espera que el estudio detecte como estadísticamente significativas a las razones de densidad de incidencia (RDI) de al menos 3.0 con un poder de prueba cercano 80%.

**Tabla 2: Estimación de poder de prueba de la conversión de Subpatente a Patente**

<b>Densidad de Incidencia (conversiones por 100 personas-semana)</b>				
<b>Expuestos (n=191)</b>	<b>No expuestos (n=391)</b>	<b>Diferencia</b>	<b>RDI*</b>	<b>Poder</b>
3.5	2.5	1	1.4	10.8%
4.5	2.5	2	1.8	24.1%
5.5	2.5	3	2.2	41.6%
6.5	2.5	4	2.6	61.5%
7.5	2.5	5	<b>3.0</b>	76.5%
8.5	2.5	6	<b>3.4</b>	<b>87.4%</b>

\* RDI: Razón de densidades de Incidencia.

**3.5.3. Aspectos éticos:** El presente estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia bajo el código de inscripción 100221.

A un total de 833 individuos que dieron las muestras de sangre para el desarrollo del estudio matriz se les explicó los objetivos y el procedimiento del estudio. Los individuos adultos que estuvieron de acuerdo firmaron el consentimiento informado y en caso de menores de edad, la firma de consentimiento estuvo a cargo de los padres o tutores. Todos los métodos fueron llevados a cabo en concordancia con las guías nacionales aprobadas. En la detección de malaria realizada por microscopía in situ, los diagnosticados con malaria recibieron tratamiento. Las muestras negativas a microscopía que fueron diagnosticadas como subpatentes mediante PCR 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 realizó un análisis secundario de las bases de datos del estudio matriz.

## **CAPÍTULO IV**

### **RESULTADOS**

#### **4.1 Población de Estudio**

La descripción de la población de estudio incluyó a los 529 individuos pertenecientes a cuatro comunidades del Distrito de Mazán (Tabla 2). La proporción de hombres (52.5%) y mujeres (47.5%) en las comunidades durante el estudio fue casi equivalente. Los grupos etarios comprendieron: de 0 a 5 años, aproximadamente la quinta parte de los individuos del estudio; de 5 a 15 años, con una proporción ligeramente mayor al grupo anterior, y el grupo mayor de 15 años, cuya proporción fue cerca de la mitad de la población de estudio. Las 4 comunidades presentaron mayor proporción de individuos con algún tipo de estudio, siendo la comunidad de Libertad la que presentó ligeramente una mayor proporción de individuos sin estudios respecto a las otras comunidades. En la comunidad de Gamitana Cocha, la ocupación más frecuente es relacionada a la actividad del agro, mientras que en Urco Miraño los oficios no relacionados al agro son los predominantes. El tipo de vivienda cerrada fue la más frecuente en las comunidades excepto en Primero de Enero que tiene mayor proporción de individuos con viviendas abiertas. La gran mayoría de la población de las cuatro comunidades tiene el río o quebrada como suministro de agua y carecen en mayoría de algún tipo de baño (desagüe). Solo la comunidad de Urco Miraño presenta cerca del 80% de individuos con servicio eléctrico, mientras en las otras 3 comunidades, esta proporción se invierte. Las fumigaciones realizadas por el MINSa abarcaron casi la totalidad de las casas en las 4 comunidades, y la comunidad con mayor porcentaje de individuos sin reporte de malaria previa confirmada por gota gruesa fueron de Urco Miraño (18.4%) (Tabla 3).

**Tabla 3: Características sociodemográficas y epidemiológicas de la población de Estudio en 4 comunidades del distrito de Mazán (N=529)**

Características	Gamitana Cocha		Libertad		Primero de Enero		Urco Miraño		Total	
	n=60	(%)	n=192	(%)	n=70	(%)	n=207	(%)	N=529	(%)
<b>Género</b>										
Masculino	30	(50.0)	102	(53.1)	39	(55.7)	108	(52.2)	279	(52.7)
Femenino	30	(50.0)	90	(46.9)	31	(44.3)	99	(47.8)	250	(47.3)
<b>Grupo de edades (años)</b>										
0 - 5 años	12	(20.0)	45	(23.4)	12	(17.1)	45	(21.7)	114	(21.6)
5-15 años	13	(21.7)	44	(22.9)	18	(25.7)	69	(33.3)	144	(27.2)
>15 años	35	(58.3)	103	(53.6)	40	(57.1)	93	(44.9)	271	(51.2)
<b>Educación</b>										
Sin estudios	14	(23.3)	57	(29.7)	15	(21.4)	51	(24.6)	137	(25.9)
Con estudios	46	(76.7)	135	(70.3)	55	(78.6)	156	(75.4)	392	(74.1)
<b>Ocupación</b>										
Trabajador del agro	35	(58.3)	89	(46.4)	33	(47.1)	72	(34.8)	229	(43.3)
No relacionado al agro	25	(41.7)	103	(53.6)	37	(52.9)	135	(65.2)	300	(56.7)
<b>Tipo de vivienda</b>										
Abierta	22	(36.7)	72	(37.5)	42	(60.0)	75	(36.2)	211	(39.9)
Cerrada	28	(46.7)	120	(62.5)	28	(40.0)	132	(63.8)	308	(58.2)
<b>Tipo de suministro de Agua</b>										
Origen fluvial	60	(100.0)	183	(95.3)	70	(100.0)	192	(92.8)	505	(95.5)
Origen no fluvial	0	(0.0)	9	(4.7)	0	(0.0)	15	(7.2)	24	(4.5)
<b>Tipo de baño</b>										
Con baño	2	(3.33)	64	(33.3)	22	(31.4)	40	(19.3)	128	(24.2)
Sin baño	58	(96.7)	128	(66.7)	48	(68.6)	167	(80.7)	401	(75.8)
<b>Cuenta con Electricidad</b>										
Si	11	(18.3)	54	(28.1)	18	(25.7)	162	(78.3)	245	(46.3)
No	49	(81.7)	138	(71.9)	52	(74.3)	45	(21.7)	284	(53.7)
<b>Fumigación anual por MINSA</b>										
Si	49	(81.7)	171	(89.1)	64	(91.4)	202	(97.6)	486	(91.9)
No	11	(18.3)	21	(10.9)	6	(8.6)	5	(2.4)	43	(8.1)
<b>Malaria previa por gota gruesa</b>										
En últimos 12 meses	52	(86.7)	171	(89.1)	60	(85.7)	169	(81.6)	452	(85.4)
Nunca	8	(13.3)	21	(10.9)	10	(14.3)	38	(18.4)	77	(14.6)
<b>PCR para P. vivax*</b>										
Positivo	26	(43.3)	139	(72.4)	38	(54.3)	168	(81.2)	371	(70.1)
Negativo	34	(56.7)	53	(27.6)	32	(45.7)	39	(18.8)	158	(29.9)
<b>Gota gruesa para P. vivax*</b>										
Positivo	4	(6.7)	26	(13.5)	22	(31.4)	60	(29.0)	112	(21.2)
Negativo	56	(93.3)	166	(86.5)	48	(68.6)	147	(71.0)	417	(78.8)

\*Se categorizó como positivos a los individuos con resultados positivos en al menos uno de los cuatro barridos

El porcentaje de casos de infecciones por *Plasmodium vivax* en al menos uno de los barridos fue mayor al 70% para las comunidades Libertad y Urco Mirañó, mientras que Gamitana Cocha y Primero de Enero tuvieron menor porcentaje de infecciones, todo esto cuando el método de diagnóstico es PCR. Estos porcentajes caen a 6.7 %, 13.5%, 31.4% y 29% para las comunidades de Gamitana Cocha, Libertad, Primero de Enero y Urco Mirañó respectivamente, cuando el método de diagnóstico empleado es de Gota Gruesa (Tabla 3).

#### **4.2 Muestreos de la población durante los 4 barridos**

A continuación, se presenta una descripción de las muestras totales del estudio que representan un total de 1730 muestras correspondiente a los cuatro barridos de los 529 individuos descritos en la tabla anterior, siendo la comunidad de Urco Mirañó la que representa cerca de la mitad del total de muestras seguido de la comunidad Libertad. La proporción de muestras correspondientes a personas que habían viajado fuera el último mes era menos del 20% en todas las comunidades. Solo Primero de Enero mostró más reportes de viajes fuera de la zona.

Las infecciones patentes representaron el 6.6% y las infecciones subpatentes representaron el 28.9% del grupo de muestras seleccionadas para el estudio. (Tabla 3). La proporción de infecciones subpatentes respecto a las infecciones patentes fue mucho mayor en el grupo de Gamitana Cocha y menor en el grupo de Primero de Enero. El 2.1% de las muestras carecía de al menos de un tipo de diagnóstico y se categorizó como tipo de infección indeterminada (Tabla 4).

**Tabla 4: Características epidemiológicas de malaria del muestreo total de la población de Estudio en 4 comunidades del distrito de Mazán a lo largo de los cuatro barridos del Estudio (N=1730)**

Características	Gamitana Cocha		Libertad		Primero de Enero		Urco Mirañó		Total	
	Muestras		Muestras		Muestras		Muestras		Muestras	
	n=155	(%)	n=615	(%)	n=218	(%)	n=742	(%)	N=1730	(%)
<b>Número de Barrido</b>										
Primer barrido	33	(21.3)	143	(23.3)	38	(17.4)	189	(25.5)	403	(23.3)
Segundo barrido	35	(22.6)	158	(25.7)	65	(29.8)	186	(25.1)	444	(25.7)
Tercer barrido	43	(27.7)	158	(25.7)	57	(26.1)	192	(25.9)	450	(26.0)
Cuarto barrido	44	(28.4)	156	(25.4)	58	(26.6)	175	(23.6)	433	(25.0)
<b>Viajó fuera el último mes</b>										
Si	22	(14.2)	50	(8.1)	59	(27.1)	66	(8.9)	197	(11.4)
No	133	(85.8)	565	(91.9)	159	(72.9)	676	(91.1)	1533	(88.6)
<b>Tipo de Infección (<i>P. vivax</i>)</b>										
Subpatentes	38	(24.5)	210	(34.1)	44	(20.2)	208	(28.0)	500	(28.9)
Patentes	4	(2.6)	26	(4.2)	24	(11.0)	61	(8.2)	115	(6.6)
Sin infección	111	(71.6)	363	(59.0)	144	(66.1)	461	(62.1)	1079	(62.4)
Indeterminado*	2	(1.3)	16	(2.6)	6	(2.7)	12	(1.6)	36	(2.1)

\* Variable con datos incompletos.

### 4.3 Densidad de Incidencia en Evolución de Subpatentes

La evolución de las infecciones subpatentes de *P. vivax* fue definida a partir del cambio de su detectabilidad hacia infección patente o volverse indetectable (al PCR y a la microscopía). Los 529 individuos fueron incluidos en el conteo del análisis (con la categorización de tipo de infección en cada uno de los 4 barridos DAC).

**Tabla 5: Incidencia de cambios de detectabilidad de individuos con infecciones subpatentes para *P. vivax* durante los 4 barridos DAC (N=529)**

<b>Cambios de detectabilidad</b>			
<b>Subpatentes</b>	<b>Casos</b>	<b>Persona - semana</b>	<b>DI*</b>
Se vuelven Patentes	27	134	20.15
Se vuelven indetectables	184	294	62.59

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

Estos individuos incluidos durante los 4 barridos DAC del estudio arrojaron un total de 134 personas-semana con 27 casos de conversión de subpatente a patente y 294 personas-semana para con 184 casos de conversión de subpatente a indetectable, empleado como denominador para el cálculo de densidad de incidencia (DI). La densidad de incidencia de pasar de subpatente a patente en esta población es de 20.15 nuevos casos por cada 100 personas-semana de seguimiento. De forma análoga, la densidad de incidencia de pasar de subpatente a indetectable en esta población es de 62.59 nuevos casos por cada 100 personas-semana de seguimiento (Tabla 5), todo esto en el intervalo de tiempo de los 4 barridos DAC.

#### **4.4 Características sociodemográficas asociadas a la evolución de infecciones subpatentes**

A partir de los resultados del tipo de evolución de las infecciones subpatentes determinado por la densidad de incidencia en los 529 individuos, se evaluó posibles asociaciones con las características sociodemográficas vistas inicialmente, principalmente con el grupo etario. De los resultados obtenidos en el análisis bivariado, solo se incluyó las características sociodemográficas de comunidad, grupo etario, nivel de estudio y antecedente de malaria reportada en la Regresión de Poisson descrita en la Tabla 6.

Los grupos de comparación para este análisis fueron elegidos por el criterio de superioridad numérica dentro de cada grupo con la finalidad de obtener índices coherentes en el modelo de regresión. No hubo hallazgos estadísticamente significativos en este análisis.

**Tabla 6: Razón de densidades para viraje de subpatente para *P. vivax* a patente y de subpatente a indetectable versus cuatro características sociodemográficas**

Ref. (Subpatentes)	Se vuelven Patentes			Se vuelven Indetectables		
	RDI	[I.C. 95%]	valor de p	RDI	[I.C. 95%]	valor de p
<b>Comunidad (Urco Miraño)</b>						
Libertad	0.5 3	0.21 1.33	0.18	0.93	0.68 1.27	0.66
Primero de Enero	2.1 9	0.87 5.49	0.09	1.11	0.67 1.85	0.69
Gamitana Cocha	0.0 0	0.00 0.00	0.99	1.06	0.59 1.90	0.86
<b>Grupo de edad (más de 15 años)</b>						
0 - 15 años	1.3 2	0.51 3.43	0.57	0.92	0.66 1.28	0.61
0 - 5 años	2.0 5	0.83 5.05	0.12	0.89	0.61 1.32	0.57
<b>Nivel de Estudios (sin estudios)</b>						
Con Estudios	0.5 5	0.25 1.20	0.13	0.94	0.68 1.31	0.73
<b>Antecedentes (sin malaria anual previa)</b>						
Con malaria anual previa	0.4 1	0.14 1.19	0.10	0.78	0.49 1.24	0.29

\*RDI: Razón de Densidad de Incidencia.

En el viraje de infecciones subpatentes de *P. vivax* a patente no se obtuvo resultados significativos en las 4 categorías evaluadas. Para la conversión de infecciones subpatentes de *P. vivax* a volverse indetectable a PCR y microscopía tampoco tuvo hallazgos significativos con alguna variable sociodemográfica (Tabla 6).

## CAPÍTULO V

### DISCUSIÓN

Entre los objetivos principales del presente estudio figura el seguimiento de las infecciones subpatentes, de las cuales se tenía antecedentes previos que ocupaban mayor proporción y eran pertenecientes a *P. vivax*, pero no se tenía suficiente información de la evolución de su detectabilidad. Esto es relevante dado que se requiere un conocimiento más amplio del comportamiento de este “reservorio de la enfermedad”. En este estudio se reconoce la importancia del método molecular para una mejor comprensión de la prevalencia de malaria, así como un enfoque escasamente estudiado en la ruta evolutiva de estas infecciones.

En este estudio se confirma la tendencia de la prevalencia superior por parte de *P. vivax* respecto a *P. falciparum* para esta región amazónica. Se comprueba también que dentro de las infecciones de *P. vivax* existe una mayor proporción de infecciones categorizadas como subpatentes. Las proporciones predominantes de infecciones subpatentes resultaron similares a los reportes realizados también en Loreto de años anteriores, como el estudio de Roshanravan y colaboradores (11) así como la superioridad numérica en el número de infectados con *P. vivax* respecto al número de infectados por *P. falciparum*. Data similar fue reportada en 2009, en donde a partir de los 25 837 casos de malaria registrados en el departamento de Loreto, 85% eran de *P. vivax* (21 942) (53). Este comportamiento concuerda incluso con estudios en zonas endémicas de otro continente, como el realizado en una Papúa, Indonesia, donde se reporta que la parasitemia detectada por PCR también fue aproximadamente el doble de la detectada por microscopía y que la parasitemia causada por *P. vivax* tuvo 1.35 veces más riesgo de ser subpatente comparado a la parasitemia causada por *P. falciparum* (26). Esto podría sugerir que esta proporción mayoritaria de infecciones de subpatentes de *P. vivax* sería característico del comportamiento de esta especie parasitaria en zonas endémicas.

Los métodos moleculares, como el qPCR, son más sensibles y específicos que la microscopía de rutina, por ello resulta importante el uso de los métodos moleculares para obtener un mejor panorama de infecciones y de la población subpatente. También se debe tener en cuenta la fluctuación de parasitemia de las infecciones de malaria sobre todo con *P. falciparum* (54). Si bien la población subpatente puede ser desestimada por los métodos de diagnóstico de rutina, es importante resaltar que esta estimación también depende del tipo de muestra. El estudio de Cheng y colaboradores reveló que la prevalencia media de infecciones subpatentes de *P. vivax* determinada por PCR utilizando sangre total fue significativamente más alta que utilizando sangre en papeles de filtro (27), siendo este último el que se empleó en el presente estudio.

Debido a la falta de data recolectada, solamente 529 individuos fueron aptos para el análisis de evolución de la subpatencia. El tipo de evolución de subpatentes de *P. vivax* más frecuente en el distrito de Mazán fue el volverse indetectable con una densidad de incidencia cerca de 3 veces la densidad de incidencia de volverse patente. En epidemiología la densidad de incidencia suele reportarse de forma operativa en casos por personas-año. Aplicando esto último, los resultados del análisis de densidad de incidencia equivalen, en la conversión de subpatente a patente, a 10.47 casos por cada persona-año, y para la conversión de subpatente a indetectable, de 32.54 casos por cada persona-año. Estos resultados fueron similares a lo reportado por estudios realizados en también en la Amazonía sudamericana. El estudio de Barbosa, realizado en Remansinho (Amazonía brasileña), halló que sólo el 17,0% de infecciones asintomáticas y subpatentes que se dejaron sin tratar se convirtieron en enfermedad clínica a lo largo de 6 semanas de seguimiento y fueron detectables por vigilancia rutinaria mediante microscopía (39). El estudio de Van de Eede y colaboradores en Iquitos también obtuvo resultados similares, con barridos mensuales a 29 individuos después del tratamiento. Si estos individuos se clasificaran en nuestro estudio, se tendría una relación entre la densidades de incidencia similares al presente estudio, teniendo una superior densidad de incidencia los casos de volverse indetectable (55). Alves y colaboradores, por su parte, reportan que el 40% de

asintomáticos (gran parte de ellos subpatente) se vuelven negativos a PCR luego de 2 meses (56) y un estudio de revisión sistemática revela una tendencia de las infecciones subpatentes en tener mayor riesgo de ser patentes durante el posterior seguimiento en comparación a pacientes negativos por PCR (57). Este comportamiento de eliminación espontánea de la malaria ha sido reportado previamente, incluso para *P. falciparum*, como el estudio realizado por Bottero y colaboradores, donde las infecciones ocasionadas por *P. falciparum* se eliminaban sin tratamiento en mujeres postparto (58). El estudio de Krostgad y colaboradores realizado en África subsahariana, zona hiperendémica, halló que en el 14% de niños las infecciones de *P. falciparum* se eliminan solas sin tratamiento (59). El estudio de Bekessy y colaboradores también reporta la eliminación espontánea en infecciones de *P. falciparum* sin el tratamiento antimalárico (60). Este comportamiento también ha sido reportado en *P. vivax*, en el mismo estudio mencionado previamente de Van den Eede y colaboradores, las infecciones se mantuvieron como subpatentes y asintomáticas durante varios meses consecutivos y se eliminaron de forma espontánea sin tratamiento (55).

Esta alta incidencia de las infecciones subpatentes en volverse indetectable podría restar su importancia epidemiológica, dando evidencia de una permanencia relativamente corta de los pacientes en el estado subpatente antes de su paso al estado de indetectable al PCR (12) significando un menor riesgo por parte del reservorio subpatente. Si consideramos la característica de baja transmisión del distrito de Mazán, y una alta incidencia en volverse indetectable de este tipo de infecciones sin tratamiento antimalárico, crea cierta incertidumbre sobre el riesgo real de este reservorio subpatente. Por ello se debe estudiar a profundidad la importancia de la permanencia de infecciones subpatentes como reservorio de la enfermedad, ya que a pesar de existir baja transmisión se puede inducir inmunidad parcial y alta proporción subpatente (55). En añadidura, estudios como los de Ockell y colaboradores respalda la teoría que las personas asintomáticas y con infección subpatente son capaces de continuar el ciclo infectando a un nuevo vector para *Plasmodium* (37). Es más, en un escenario de alta transmisión se puede esperar infecciones patentes y poder tratarlas, pero en baja transmisión las infecciones subpatentes pasan

desapercibidas a pesar de ser las predominantes (37), es decir que el papel de las infecciones subpatentes puede ser mínimo en un escenario de alta transmisión pero relevante en baja transmisión. Esto cobra sentido al considerar que los pacientes sintomáticos, que suelen ser patentes, son tratados raudamente y se exponen pocos días los mosquitos para continuar la infección a diferencia de los portadores asintomáticos que permanecen infectivos por periodos mucho más largos (56).

Se han realizado estudios exhaustivos incluyendo pruebas entomológicas para ver la capacidad de las infecciones subpatentes en continuar el ciclo de infección, y en efecto, infecciones con gametocitemia subpatente son capaces de continuar la transmisión hacia el vector, como se indica en el estudio realizado por Schneider (61). El estudio de Alves y colaboradores revela que una gran proporción de pacientes subpatentes y/o asintomáticos de malaria, si bien tendrían 22 veces menor capacidad de transmitir la infección que individuos sintomáticos, su naturaleza crónica y el mayor depósito de las infecciones asintomáticas podría potenciar esta baja transmisibilidad (56). El estudio de Slater y colaboradores reporta incluso una razón de 3 a 1 entre la capacidad de transmisión de infecciones patentes respecto a las infecciones subpatentes resaltando también la peligrosidad de estas últimas con infecciones duraderas en entornos de baja transmisión (57). Por otro lado, esta perspectiva más amplia del rol de las infecciones subpatentes descolocaría a las DPC como una estrategia adecuada para la eliminación de malaria en la Amazonía peruana. Si bien se sabe que esta desestima a los pacientes asintomáticos, gran proporción de estos son subpatentes y un importante reservorio de la enfermedad. Las DAC, por otro lado, logran alcanzar al menos a pacientes asintomáticos y ha logrado mejores resultados que la DPC para la estimación de la prevalencia de malaria (12).

Los resultados del estudio no arrojaron asociaciones significativas en la regresión de Poisson, esto debido a múltiples factores posibles. Entre ellos se puede describir que siendo un análisis de datos secundarios, el estudio no habría tenido un tamaño de muestra suficiente para detectar estas asociaciones. Y los estudios de diseños similares de seguimiento de infecciones mediante detectabilidad por PCR son escasos. El presente

estudio tuvo un poder de 80% para detectar riesgos relativos de al menos 3, pero la regresión realizada arrojó valores menores a 2.

Sin embargo, este estudio deja puntos clave para los posteriores que se puedan hacer sobre la evolución de las infecciones de malaria detectables solo por PCR. En estudios futuros que se puedan desarrollar, se sugiere plantear la hipótesis que los grupos de menor edad podrían hallarse asociados a mayor riesgo de conversión de las infecciones subpatentes de *P. vivax* en infecciones patentes. Esto se apoya en que los niños están en mayor riesgo ante una enfermedad infecciosa entre seis meses y cinco años de edad ya que han perdido la inmunidad materna y aún no han desarrollado inmunidad específica a la infección (62). Tal es el caso que en Papúa, Indonesia (zona endémica al igual que Mazán), se reportó que el riesgo de tener infecciones subpatentes aumenta de manera constante con la edad, donde el grupo de 5 a 15 años tuvo 2.35 veces mayor riesgo que el grupo menor a 5 años, y el grupo mayor a 15 años tuvo 3.82 veces mayor riesgo respecto al grupo menor a 5 años de tener una infección subpatente (26). Otro argumento que apoyaría esta hipótesis es la característica genética de *Plasmodium* en la Amazonía. Van den Eede y colaboradores, en Iquitos, sugiere que la estructura de la población clonal con la baja diversidad de población de parásitos probablemente este contribuyendo a una rápida adquisición de inmunidad (55). Esta inmunidad se vería reflejada en la población adulta más que en la joven o infante dado su mayor probabilidad de haber estado en contacto con el parásito tanto como por el desarrollo del sistema inmune. Los pobladores de áreas endémicas están expuestos de forma recurrente a las infecciones de *Plasmodium spp.* y la inmunidad adquirida de estos podría explicar la baja parasitemia prevalente en las regiones endémicas comparado con los menos expuestos de la misma región, en donde se incluye a los niños menores (26,63).

Dentro de los aspectos sociodemográficos a destacar, se vio que, en la comunidad de Primero de Enero, existía una mayor proporción de subcategorías relacionadas a la carencia de recursos económicos como: mayor proporción de casas sin baño, con tipo de vivienda abierto y casi la totalidad con suministro de agua fluvial (río o quebrada). Esta se contrastó con la población de la comunidad de Urco Miraflores, que incluso contó con casi la totalidad

de su población con servicio eléctrico. A esto, Urco Miraño es la comunidad con mayor número y proporción de personas que nunca han tenido Malaria confirmado por Gota Gruesa, y aparentemente podría significar que un mejor abastecimiento de recursos y servicios básicos estaría asociado con un menor riesgo de Malaria en la población Amazónica, tal como se explica en el estudio de Sharma y colaboradores, donde determinan que los factores socioeconómicos como el tipo de paredes de la casa, el lugar de la fuente de agua potable, las tierras de regadío, los cultivos comerciales, las variables de comportamiento como lugar de dormir y el uso de mosquiteros, se encuentran asociados significativamente con la prevalencia de malaria en análisis univariado (64). Además, en una comunidad de pocos recursos los grupos de menor edad, quienes serían los susceptibles a infecciones patentes, estarían más expuestos como reporta el estudio de Matthys y colaboradores, donde el riesgo para contraer malaria en niños menores de 15 años incluía vivir en una zona de bajos recursos de índole agrícola, cerca de estanques permanentes con y sin peces, pernoctaciones periódicas en chozas temporales de granja y bajo estatus socioeconómico (65).

Los hallazgos del presente estudio sugieren que podría ser suficiente con los barridos de las DAC realizados por microscopía dado que la población sin tratamiento subpatente se estaría resolviendo de forma espontánea y no haría falta emplear recursos más exhaustivos. Sin embargo, esta población subpatente podría ser un reservorio con capacidad de continuar la transmisión de malaria en esta zona, y mientras avancen los programas de erradicación de la malaria, se tendrá mayor proporción subpatente con un rol creciente en el ciclo de transmisión (37). No obstante, este es un estudio preliminar, que da algunas luces sobre la evolución de infecciones subpatentes por lo que se requiere más estudios con seguimientos más periódicos y largos para reafirmar esto y comprender la dinámica epidemiológica de la zona.

## CAPÍTULO VI

### CONCLUSIONES

Se concluye que la evolución de las infecciones subpatentes de *P. vivax* más frecuente en el distrito de Mazán es volverse indetectables (DI: 62.59 conversiones por 100 personas-semana) con seguimiento en el intervalo de los 4 barridos DAC. Las infecciones subpatentes de *P. vivax* ocupan una proporción considerable de los casos de malaria en el distrito de Mazán y tienen el potencial de ser un importante reservorio de la enfermedad, por lo que son necesarios estudios que hagan seguimiento a este tipo de infecciones. El presente estudio abre camino para investigaciones posteriores sobre la evolución de la detectabilidad de las infecciones subpatentes en la Amazonía.

## CAPÍTULO VII

### RECOMENDACIONES Y LIMITACIONES

En la metodología del presente estudio se tienen algunas observaciones que van desde la colección de muestras, el diagnóstico de microscopía y el qPCR. Esto podría ser influyente en el estudio dado que factores involucrados en la recolección de muestras como el volumen de sangre para el diagnóstico, así como el tipo de PCR han demostrado ser críticos para determinar la prevalencia de malaria (66) y tienen efecto directo en la determinación de la proporción subpatente. Otra limitación que tuvo este estudio fue de no poder hacer un análisis cuantitativo en seguimiento de la parasitemia a número de parásitos por microlitro. Esto pudo corregirse con un ajuste al volumen por glóbulos blancos con algún otro método molecular para cuantificación de glóbulos blancos. El diagnóstico en campo puede ser un obstáculo para la estimación precisa de la prevalencia, también resulta costoso y poco aséptico de alcanzar para el procedimiento de qPCR. Existen métodos destinados al trabajo de campo como LAMP, con mayor sensibilidad y poca cantidad de muestra requerida, sin embargo, ha demostrado poca precisión en el diagnóstico en individuos con baja parasitemia y que la calidad del PCR puede ser particularmente afectada por el tipo de recolección y el volumen de sangre usado para la extracción de ADN.

Otra limitación importante reside en ser un análisis de datos secundarios por lo que los valores arrojados en el modelo de regresión de Poisson arrojaron RDI's menores a los esperados para una potencia de prueba superior al 80%. Si bien el estudio del cual se tomaron los datos fue de cohorte prospectiva, el diseño no pudo responder a fondo las preguntas de investigación y se requiere una data más adecuada para evaluar los seguimientos, diferenciar recaídas y reinfecciones, así como terminar el comportamiento por especie. Por ejemplo, se sugiere proyectar un seguimiento más exhaustivo que el adaptado en el presente estudio. El número de muestras por comunidad no eran homogéneas y se recomienda que en estudios posteriores se controle mejor el diseño de muestras incluidas en el estudio, así como la cohorte posea mayor número de barridos y

acortar el tiempo entre barridos para obtener unos patrones más definidos y de ser posible que este sea aproximado con la carga parasitaria. Este estudio podría tener otra categorización del comportamiento de las infecciones subpatentes en caso de contar la cantidad aproximada de carga parasitaria durante cada barrido, el cual sería más útil para una mejor comprensión de esta dinámica. Se esperan nuevos estudios aplicando esta categorización del comportamiento de las infecciones y análisis que asocien a estos con la población clonal de *P. vivax*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carbajal F, Quintana J, Chauca H, Watts DM. FR. Presencia del A. (N) darlingi (Diptera: Culicidae), en alrededores de la ciudad de Iquitos, Loreto-Peru. Soc Peru Enfermedades Infecc Trop. 1996;5:10-2.
2. WHO. World Malaria Report 2015, regional and country profile. Geneve; 2015.
3. Chapilliquén F. Situación epidemiológica de la malaria en el Perú 2016 ,semana epidemiológica N° 52. Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades,;
4. Lainhart W, Bickersmith SA, Nadler KJ, Moreno M, Saavedra MP, Chu VM, et al. Evidence for temporal population replacement and the signature of ecological adaptation in a major Neotropical malaria vector in Amazonian Peru. Malar J. 2015 Sep 29;14(1):375.
5. Aramburú Guarda J, Ramal Asayag C, Witzig R. Malaria reemergence in the Peruvian Amazon region. Emerg Infect Dis. 1999 Apr;5(2):209–15.
6. Fernández R, Vera H, Calderón G. Revisión histórica de la distribución de Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi (Diptera: culicidae) en la Amazonía peruana. Rev Peru Med Exp Salud Pública [Internet]. 2014 Jul 2 [cited 2019 Jan 5];31(2). Available from: <https://rpmesp.ins.gob.pe/index.php/rpmesp/article/view/52>
7. Chapilliquen F. Situación Epidemiológica de la malaria en el Perú, a la SE 11 – 2017. 2017.
8. Rosas-Aguirre A, Gamboa D, Manrique P, Conn JE, Moreno M, Lescano AG, et al. Epidemiology of Plasmodium vivax Malaria in Peru. Am J Trop Med Hyg. 2016 Dec 28;95(6 Suppl):133–44.
9. MINSA. Red Nacional de Epidemiología - Perú, hasta la SE 33. RENACE– DGE.; 2015.
10. MINSA - Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades, de la Red Nacional de Epidemiología . Boletín Epidemiológico Semana epidemiológica N° 02. RENACE– DGE.; 2015.
11. Roshanravan B, Kari E, Gilman RH, Cabrera L, Lee E, Metcalfe J, et al. Endemic malaria in the Peruvian Amazon region of Iquitos. Am J Trop Med Hyg. 2003 Jul;69(1):45–52.
12. Branch O, Casapia WM, Gamboa DV, Hernandez JN, Alava FF, Roncal N, et al. Clustered local transmission and asymptomatic Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax malaria infections in a recently emerged, hypoendemic Peruvian Amazon community. Malar J. 2005 Jun 23;4:27.
13. Pherez FM, Cunha BA. Diagnostic importance of headache as a key symptom in suspecting malaria in adult returning travelers. Travel Med Infect Dis. 2009 Nov;7(6):383–4.

14. Rodriguez-Morales AJ, Herrera-Martínez AD, Herrera-Martínez Y. Imported cases of malaria admitted to a hospital in Western Venezuela, 1998-2009. *Travel Med Infect Dis.* 2010 Jul;8(4):269–71.
15. Dotrário AB, Menon LJB, Bollela VR, Martinez R, de Almeida e Araújo DC, da Fonseca BAL, et al. Malaria and other febrile diseases among travellers: the experience of a reference centre located outside the Brazilian Amazon Region. *Malar J* [Internet]. 2016 May 26 [cited 2019 Jan 5];15. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4882771/>
16. Clayton AM, Dong Y, Dimopoulos G. The Anopheles innate immune system in the defense against malaria infection. *J Innate Immun.* 2014;6(2):169–81.
17. Vlachou D, Schlegelmilch T, Runn E, Mendes A, Kafatos FC. The developmental migration of Plasmodium in mosquitoes. *Curr Opin Genet Dev.* 2006 Aug;16(4):384–91.
18. WHO. Malaria. Geneva; 2017.
19. Carlton JM, Adams JH, Silva JC, Bidwell SL, Lorenzi H, Caler E, et al. Comparative genomics of the neglected human malaria parasite Plasmodium vivax. *Nature.* 2008 Oct 9;455(7214):757–63.
20. Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinniss MH. The resistance factor to Plasmodium vivax in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N Engl J Med.* 1976 Aug 5;295(6):302–4.
21. Karl S, Gurarie D, Zimmerman PA, King CH, St Pierre TG, Davis TME. A sub-microscopic gametocyte reservoir can sustain malaria transmission. *PloS One.* 2011;6(6):e20805.
22. White NJ, Imwong M. Relapse. *Adv Parasitol.* 2012;80:113–50.
23. Joanny F, Löhr SJZ, Engleitner T, Lell B, Mordmüller B. Limit of blank and limit of detection of Plasmodium falciparum thick blood smear microscopy in a routine setting in Central Africa. *Malar J.* 2014 Jun 14;13:234.
24. Wongsrichanalai C, Barcus MJ, Muth S, Sutamihardja A, Wernsdorfer WH. A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT). *Am J Trop Med Hyg.* 2007 Dec;77(6 Suppl):119–27.
25. Trampuz A, Jereb M, Muzlovic I, Prabhu RM. Clinical review: Severe malaria. *Crit Care Lond Engl.* 2003 Aug;7(4):315–23.
26. Pava Z, Burdam FH, Handayuni I, Trianty L, Utami RAS, Tirta YK, et al. Submicroscopic and Asymptomatic Plasmodium Parasitaemia Associated with Significant Risk of Anaemia in Papua, Indonesia. *PloS One.* 2016;11(10):e0165340.
27. Cheng Q, Cunningham J, Gatton ML. Systematic review of sub-microscopic P. vivax infections: prevalence and determining factors. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015 Jan;9(1):e3413.

28. Imwong M, Hanchana S, Malleret B, Rénia L, Day NPJ, Dondorp A, et al. High-throughput ultrasensitive molecular techniques for quantifying low-density malaria parasitemias. *J Clin Microbiol.* 2014 Sep;52(9):3303–9.
29. Adams M, Joshi SN, Mbambo G, Mu AZ, Roemmich SM, Shrestha B, et al. An ultrasensitive reverse transcription polymerase chain reaction assay to detect asymptomatic low-density *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections in small volume blood samples. *Malar J.* 2015 Dec 23;14:520.
30. Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol.* 1993 Apr;58(2):283–92.
31. Moody A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clin Microbiol Rev.* 2002 Jan;15(1):66–78.
32. Mangold KA, Manson RU, Koay ESC, Stephens L, Regner M, Thomson RB, et al. Real-Time PCR for Detection and Identification of *Plasmodium* spp. *J Clin Microbiol.* 2005 May;43(5):2435–40.
33. Andrade BB, Reis-Filho A, Barros AM, Souza-Neto SM, Nogueira LL, Fukutani KF, et al. Towards a precise test for malaria diagnosis in the Brazilian Amazon: comparison among field microscopy, a rapid diagnostic test, nested PCR, and a computational expert system based on artificial neural networks. *Malar J.* 2010 May 6;9:117.
34. Coura JR, Suárez-Mutis M, Ladeia-Andrade S. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006 May;101(3):229–37.
35. da Silva-Nunes M, Ferreira MU. Clinical spectrum of uncomplicated malaria in semi-immune Amazonians: beyond the " symptomatic " vs " asymptomatic " dichotomy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007 Jun;102(3):341–7.
36. Okell LC, Ghani AC, Lyons E, Drakeley CJ. Submicroscopic infection in *Plasmodium falciparum*-endemic populations: a systematic review and meta-analysis. *J Infect Dis.* 2009 Nov 15;200(10):1509–17.
37. Okell LC, Bousema T, Griffin JT, Ouédraogo AL, Ghani AC, Drakeley CJ. Factors determining the occurrence of submicroscopic malaria infections and their relevance for control. *Nat Commun.* 2012;3:1237.
38. Alves FP, Durlacher RR, Menezes MJ, Krieger H, Silva LHP, Camargo EP. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. *Am J Trop Med Hyg.* 2002 Jun;66(6):641–8.
39. Barbosa S, Gozze AB, Lima NF, Batista CL, Bastos M da S, Nicolete VC, et al. Epidemiology of disappearing *Plasmodium vivax* malaria: a case study in rural Amazonia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014 Aug;8(8):e3109.

40. Versiani FG, Almeida ME, Melo GC, Versiani FO, Orlandi PP, Mariúba LAM, et al. High levels of IgG3 anti ICB2-5 in Plasmodium vivax-infected individuals who did not develop symptoms. *Malar J.* 2013 Aug 27;12(1):294.
41. Cheng Y, Wang Y, Ito D, Kong D-H, Ha K-S, Chen J-H, et al. The Plasmodium vivax Merozoite Surface Protein 1 Paralog Is a Novel Erythrocyte-Binding Ligand of P. vivax. *Infect Immun.* 2013 May;81(5):1585–95.
42. Rosas-Aguirre A, Llanos-Cuentas A, Speybroeck N, Cook J, Contreras-Mancilla J, Soto V, et al. Assessing malaria transmission in a low endemicity area of north-western Peru. *Malar J.* 2013 Sep 22;12:339.
43. Harris I, Sharrock WW, Bain LM, Gray K-A, Bobogare A, Boaz L, et al. A large proportion of asymptomatic Plasmodium infections with low and sub-microscopic parasite densities in the low transmission setting of Temotu Province, Solomon Islands: challenges for malaria diagnostics in an elimination setting. *Malar J.* 2010 Sep 7;9:254.
44. Lin E, Kiniboro B, Gray L, Dobbie S, Robinson L, Laumaea A, et al. Differential patterns of infection and disease with P. falciparum and P. vivax in young Papua New Guinean children. *PLoS One.* 2010 Feb 4;5(2):e9047.
45. Roper MH, Torres RS, Goicochea CG, Andersen EM, Guarda JS, Calampa C, et al. The epidemiology of malaria in an epidemic area of the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* 2000 Feb;62(2):247–56.
46. da Silva-Nunes M, Moreno M, Conn JE, Gamboa D, Abeles S, Vinetz JM, et al. Amazonian malaria: asymptomatic human reservoirs, diagnostic challenges, environmentally driven changes in mosquito vector populations, and the mandate for sustainable control strategies. *Acta Trop.* 2012 Mar;121(3):281–91.
47. WHO. Disease surveillance for malaria elimination. Geneva; 2012.
48. McCutchan TF, Li J, McConkey GA, Rogers MJ, Waters AP. The cytoplasmic ribosomal RNAs of Plasmodium spp. *Parasitol Today.* 1995 Apr 1;11(4):134–8.
49. R: The R Project for Statistical Computing [Internet]. [cited 2019 Jan 5]. Available from: <https://www.r-project.org/>
50. Community-randomized trial of lambda-cyhalothrin-treated hammock nets for malaria control in Yanomami communities in the Amazon region of Venezuela - Magris - 2007 - Tropical Medicine & International Health - Wiley Online Library [Internet]. [cited 2019 Dec 14]. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1365-3156.2006.01801.x>
51. Cox C, Chu H, Muñoz A. Survival attributable to an exposure. *Stat Med.* 2009 Nov 20;28(26):3276–93.

52. Poisson Regression | Stata Annotated Output [Internet]. [cited 2019 Dec 14]. Available from: <https://stats.idre.ucla.edu/stata/output/poisson-regression/>
53. MINSA - Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades, de la Red Nacional de Epidemiología . Situación de la malaria en el Perú. RENACE– DGE.; 2009.
54. O’Meara WP, Collins WE, McKenzie FE. Parasite Prevalence: A Static Measure of Dynamic Infections. *Am J Trop Med Hyg.* 2007 Aug;77(2):246–9.
55. Van den Eede P, Soto-Calle VE, Delgado C, Gamboa D, Grande T, Rodriguez H, et al. Plasmodium vivax sub-patent infections after radical treatment are common in Peruvian patients: results of a 1-year prospective cohort study. *PloS One.* 2011 Jan 28;6(1):e16257.
56. Alves FP, Gil LHS, Marrelli MT, Ribolla PEM, Camargo EP, Da Silva LHP. Asymptomatic carriers of Plasmodium spp. as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon. *J Med Entomol.* 2005 Sep;42(5):777–9.
57. Slater HC, Ross A, Felger I, Hofmann NE, Robinson L, Cook J, et al. The temporal dynamics and infectiousness of subpatent Plasmodium falciparum infections in relation to parasite density. *Nat Commun.* 2019 Mar 29;10(1):1433.
58. Bottero J, Briand V, Agbowai C, Doritchamou J, Massougbdji A, Cot M. Spontaneous Postpartum Clearance of Plasmodium falciparum Parasitemia in Pregnant Women, Benin. *Am J Trop Med Hyg.* 2011 Feb 4;84(2):267–9.
59. Krogstad DJ, Koita OA, Diallo M, Gerone JL, Poudiougou B, Diakité M, et al. Molecular incidence and clearance of Plasmodium falciparum infection. *Malar J* [Internet]. 2015 Oct 22 [cited 2019 Feb 10];14. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4618950/>
60. Bekessy A, Molineaux L, Storey J. Estimation of incidence and recovery rates of Plasmodium falciparum parasitaemia from longitudinal data. *Bull World Health Organ.* 1976;54(6):685–93.
61. Schneider P, Bousema JT, Gouagna LC, Otieno S, van de Vegte-Bolmer M, Omar SA, et al. Submicroscopic Plasmodium falciparum gametocyte densities frequently result in mosquito infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2007 Mar;76(3):470–4.
62. Schumacher R-F, Spinelli E. Malaria in Children. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2012 Jan 15;4:e2012073.
63. Sachs P, Diaz Rodriguez GA, Briceno I, King R, Achee NL, Grieco JP. Comparison of experimental hut entrance and exit behavior between Anopheles darlingi from the Cayo District, Belize, and Zungarococha, Peru. *J Am Mosq Control Assoc.* 2013 Dec;29(4):319–27.

64. Sharma RK, Singh MP, Saha KB, Bharti PK, Jain V, Singh PP, et al. Socio-economic & household risk factors of malaria in tribal areas of Madhya Pradesh, central India. *Indian J Med Res.* 2015 May;141(5):567–75.
65. Matthys B, Vounatsou P, Raso G, Tschannen AB, Becket EG, Gosoniu L, et al. Urban farming and malaria risk factors in a medium-sized town in Cote d'Ivoire. *Am J Trop Med Hyg.* 2006 Dec;75(6):1223–31.
66. Rosas-Aguirre A, Ponce OJ, Carrasco-Escobar G, Speybroeck N, Contreras-Mancilla J, Gamboa D, et al. *Plasmodium vivax* malaria at households: spatial clustering and risk factors in a low endemicity urban area of the northwestern Peruvian coast. *Malar J.* 2015 Apr 24;14:176.

## ANEXOS

### ANEXO 1

#### Protocolo de extracción de ADN:

##### Preparación de buffer TEN 2X:

NaCl.....0.2 M

Tris-HCl pH 8.....0.02 M

EDTA pH 8.....0.002 M

##### Preparación de Elution buffer:

Antes de empezar el procedimiento calentar el elution buffer a 65°C.

##### Preparación de HBC buffer:

Agregar 32mL de isopropanol, seguidamente agitar vigorosamente y almacenar a temperatura de ambiente. Hacer una marca en la etiqueta de la botella para indicar que el isopropanol ha sido agregado.

##### Preparación de DNA WASH buffer:

Agregar 100ml de etanol absoluto. Hacer una marca en la etiqueta de la botella para indicar que el etanol ha sido agregado. Antes de empezar con el procedimiento homogenizar el reconstituido mediante agitación

1. Desinfectar una tijera con alcohol y secarla, luego proceder a cortar una patita del papel filtro en un tubo de 1.5 mL (aproximadamente un área impregnada con sangre de 0.25mm<sup>2</sup>). Limpie la tijera nuevamente antes de cortar otro papel filtro.
2. Agregue 250 µl de buffer TEN 2X, 180 µl de agua y 50 µl de SDS 10% a la muestra. Vortex a máxima velocidad por 10 segundos. (asegurarse que la totalidad del papel filtro este sumergido dentro del buffer TEN)
3. Incubar a 65 °C por 1 hora. Agitar con vortex brevemente cada 20 min.
4. Adicionar 25 µl de OB Proteasa y agitar con vortex a máxima velocidad por 15 segundos.
5. Incubar a 65°C por 30minutos. Agitar con vortexe varias veces durante la incubación.

6. Centrifugar a 11500 rpm (13000 g) por 5 min.
7. Transferir el sobrenadante a un microtubo de 1.5 ml. Hacer presión sobre el papel filtro para dejarlo seco.
8. Adicionar 250 µl de Buffer BL y 250 µl de etanol absoluto. Agitar cuidadosamente con vortex.
9. Centrifugar brevemente para remover las gotas de la tapa.
10. Insertar la HiBind DNA mini column en un tubo colector de 2 ml.
11. Agregar 500 µl del sobrenadante y centrifugar a 8000 rpm (6000 g) por 1 minuto.
12. Descartar el filtrado y reusar el tubo colector.
13. Repetir el paso 11 para transferir todo el sobrenadante y elimine el tubo colector
14. Insertar la HiBind DNA mini column en un nuevo colector de 2ml
15. Adicionar 500 ul de HBC Buffer (el HBC buffer debe estar diluido con isopropanol)
16. Centrifugar a 8000 rpm (6000 g) por 1 minuto
17. Descartar el filtrado y reúse el tubo colector de 2ml
18. Adicionar 700ul DNA wash buffer(el DNA wash buffer debe estar diluido con etanol)
19. Centrifugar a 8000 rpm (6000 g) por 1 minuto
20. Descartar el filtrado y reúse el tubo de colección de 2ml
21. Repetir el paso 18 al 20 para un segundo lavado y elimine el tubo colector
22. Utilizar un nuevo tubo colector de 2 ml y centrifugar por 2 minutos a máxima velocidad (12000 rpm ó 14000 g) para secar la minicolumna.
23. Transferir la HiBind DNA mini column en un microtubo de 1.5ml.
24. Adicionar 50ul de Elution buffer calentado a 65°C.
25. Dejar reposar HiBind DNA mini column 5 minutos a 65°C.
26. Centrifugar a 12000 rpm (14000 g) por 1 minuto.
27. Almacenar el ADN a -20 °C

## ANEXO 2

### Protocolo de detección, identificación y cuantificación de ADN de *Plasmodium spp.* por Real-Time PCR

#### Reactivos y Soluciones:

#### Reactivos para Preparación de Master Mix.

1. PerfeCTa® SYBR® Green FastMix®.
2. Primer Forward: 5-TAACGAACGAGATCTTAA-3
3. Primer Reverse: 5-GTTCCTCTAAGAAGCTTT-3
4. Agua libre de DNAsas.

#### Alícuota de Primer en concentración de trabajo:

Diluir el stock de primer (100µM) 1:10 con Agua libre de DNAsas, así se obtendrá primer a 10µM listo para usar.

#### Controles positivos:

1. ADN de *P. falciparum* (Xng/uL).
2. ADN de *P. vivax* (Xng/uL)

#### Preparación de la curva estándar:

La preparación de la curva estándar tanto de *Plasmodium falciparum* como de *Plasmodium vivax*, se realizará en un ambiente separado al usado para la extracción de ADN y cargado de muestra, y se limpiará con abundante lejía y se expondrá a luz UV por 15 minutos antes y después de la preparación de cada plásmido. La preparación de la curva estándar de *P. falciparum* y *P. vivax* se realizará por separado y al inicio de cada día de trabajo.

1. Repartir 27µl de agua de PCR en 3 tubos de 1,5ml y rotularlos de la siguiente manera: 200 c/µl, 20 c/µl y 2 c/µl (colocar en la parte superior *P. falciparum* o *P. vivax* según corresponda).

2. Descongelar una alícuota de 30  $\mu$ l de plásmido que se encuentra a la concentración de 2000 c/ $\mu$ l y limpiar con lejía el tubo por fuera; y centrifugar el tubo a máxima velocidad por 3-5 minutos.

3. Homogenizar con un tip de 20 $\mu$ l el plásmido (tubo a concentración de 2000 c/ $\mu$ l), y transferir 3 $\mu$ l al tubo al tubo de 200 c/ $\mu$ l.

4. Homogenizar con un tip de 20 $\mu$ l el plásmido (tubo a concentración de 200 c/ $\mu$ l), y transferir 3 $\mu$ l al tubo al tubo de 20 c/ $\mu$ l. Repetir este proceso hasta llegar al tubo de 2 c/ $\mu$ l.

5. Finalmente centrifugar todos los tubos a máxima velocidad por 3-5 minutos y guardarlos a 4°C. Limpiar con abundante lejía y luz UV la mesa de trabajo.

Nota: la curva estándar preparada se utilizará en cada placa de PCR en tiempo real que se trabaje durante el día (máximo 5 placas por día), al finalizar el día se deberán descartar los tubos.

#### **Preparación de la reacción de PCR:**

1. Descongelar los reactivos: PerfeCTa® SYBR® Green FastMix®, primers forward y reverse y agua libre de DNAsas.

2. Colocar dentro del ambiente para la preparación de master mix las micropipetas y las cajas abiertas de los tips con filtro de diferentes volúmenes, un rack para tubos de 1.5mL. la placa de 96 pozos, un tubo de 1.5 mL y un depósito para descarte de Tips. Irradiar por 15 minutos.

3. Homogenizar con el vortex cada uno de los reactivos previamente descongelados y preparar un master mix en el tubo de 1.5 mL de acuerdo al siguiente orden y cantidades:

<b>Componentes</b>	<b>Concentración Inicial</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Volumen 1X (<math>\mu</math>l)</b>
H <sub>2</sub> O			6
PerfeCTa® SYBR® Green FastMix®	2X	1X	12.5
Primer Forward	10 $\mu$ M	0.3 $\mu$ M	0.75
Primer Reverse	10 $\mu$ M	0.3 $\mu$ M	0.75
ADN problema			5
<b>Volumen Total</b>			<b>25</b>

4. Calcular el volumen total del master mix para el número total de reacciones en la placa incluyendo controles positivos y negativos. Incluir un 10% en exceso en el volumen final por pérdida durante el pipeteo.

5. Homogenizar el master mix usando el vortex.
6. Colocar 20ul de master mix en cada pozo de la placa que se vaya a utilizar.
7. En un ambiente separado, colocar 5µl de ADN de cada muestra y de los controles positivos y las curvas estándar siguiendo el diseño de la figura 1 (los controles positivos y las diluciones de la curva estándar se mantendrán a 4°C hasta el momento que sean cargados en la placa). Homogenizar con la micropipeta al momento de colocar cada muestra.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s
B	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s
C	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s
D	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s
E	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s
F	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s
G	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s	Unk 18s
H	Std 1.00E+01 P. falciparum	Std 1.00E+02 P. falciparum	Std 1.00E+03 P. falciparum	Std 1.00E+04 P. falciparum	Pos 18s P. falciparum	NTC 18s	Std 1.00E+01 P. vivax	Std 1.00E+02 P. vivax	Std 1.00E+03 P. vivax	Std 1.00E+04 P. vivax	Pos 18s P. vivax	NTC 18s

figura 1: diseño de placa para la detección, identificación y cuantificación de ADN de Plasmodium sp. por real-time PCR; Unk representa a las muestras problema; Std, la curva estándar para cada especie de Plasmodium y su respectiva concentración en reacción (10, 100, 1000 y 10000 c/Rx); Pos, control positivo para cada especie; NTC, Blanco; y 18s, gen target.

8. Sellar la placa usando el film óptico. Evitar dejar huellas sobre el film con ayuda de un paño suave.
9. Encender el equipo de Real-Time PCR CFX Connect™ Bio-Rad y abrir la tapa presionando el botón rectangular debajo del logo de Bio-Rad.
10. Colocar la placa dentro del equipo en el bloque metálico de 96 pozos, verificar que la placa esté colocada correctamente.

#### Programación de la corrida de PCR en el CFX Manager™ Software Bio-Rad:

1. Encender la Laptop.
2. Colocar la clave de seguridad
3. Abrir el programa CFX Manager™ haciendo clic en el icono correspondiente en el escritorio.

4. Verificar que en el espacio izquierdo "Detected Instrument(s) Indique el serial Number del equipo CFX: BR00A1156: Idle"
5. En el menú "Startup Wizard", verificar que en la pestaña esté indicado "CFX Connect" y seleccionar la opción "Create a new Run" y hacer clic en OK se abrirá la ventana "Run Setup"
6. En la pestaña "Protocol", hacer clic en la opción "select Exiting" y seleccionar el archivo: **Dx 18s PLF1-2 Quanta.prcl**. El protocolo deberá consistir de los siguientes pasos:

ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Denaturación Inicial	95°C	2 min	1
Denaturación	95°C	20 seg	45
Hibridación	52°C	20 seg	
Extensión	68°C	30 seg	
Extensión Final	68°C	3 min	1
Denaturación	95°C	10 seg	1
Curva Melting	60 hasta 90°C	Incremento 0.5 °C Tiempo 5 seg.	
Cooling	25°C	1 min	1

7. Seleccionar la pestaña "Plate", hacer clic en la opción " Select Exiting " y seleccionar el archivo: **Diagnostic Plate.pltd**.
8. Seleccionar la pestaña "Edit Selected", luego seleccionar la pestaña "Editing Tools" y hacer click en la opcion Spreadsheet view/importer.
9. Colocar el nombre de cada muestra en la columna "\*Sample Name".
10. Corroborar que todos los datos estén correctos y concuerden con la forma en la que se han cargado las muestras. en caso de alguna modificación se puede editar la placa luego de realizarse la corrida.
11. Una vez finalizado el diseño de la placa, hacer clic en la opción "OK".
12. En la pestaña "Start Run", verificar que en el recuadro "Run Information" este indicado correctamente el archivo del protocolo en "Protocol" y el archivo de la placa en "Plate". Verificar que en la opción "Scan Mode" se indique "All Channels".
13. En el recuadro "Start Run on Selected Block(s)", verificar que haya un check en la casilla correspondiente al "Block Name" 8R001156.
14. En caso que la tapa del equipo CFX Connect esté abierta, hacer clic en la opción "Close Lid". En caso que la tapa esté cerrada, hacer clic en la opción "Start Run".

### ANEXO 3