



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

FACTORES AMBIENTALES Y HUMANOS
ASOCIADOS A LA PRESENCIA DE
GAMETOCITEMIA EN ZONAS DE BAJA
TRANSMISIÓN DE MALARIA EN LA
AMAZONIA PERUANA.

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

JUAN JOSÉ CONTRERAS MANCILLA

LIMA-PERU

2017

ASESOR

DIONICIA GAMBOA PhD

DEDICATORIA

A mi madre que me ha apoyado incondicionalmente en todo momento de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora Dionicia Gamboa y co-asesor Oscar Nolasco por su tiempo, paciencia, apoyo y asesoría durante el desarrollo de esta Tesis.

A Anna Rosanas-Urgel y Eduard Rovira-Vallbona por su tiempo y apoyo durante la capacitación en el ITM Amberes y asesoría durante el desarrollo de esta tesis.

A Nancy Suarez por el apoyo en la parte técnica del procesamiento de muestras de este trabajo.

A Gabriel Carrasco por su apoyo en el análisis estadístico del presente trabajo.

Al laboratorio de Malaria, la Unidad de Epidemiología Molecular (UEM) y Laboratorio Satélite UCSD-UPCH.

A Karina Cancino por su aliento y apoyo durante todo el desarrollo de esta tesis.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

- Los estudios de Maestría fueron financiados por el Centro Internacional FOGARTY del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica.
- La capacitación y desarrollo experimental fue financiado por la Dirección General de Cooperación al Desarrollo de Bélgica (DGD, http://diplomatie.belgium.be/en/policy/development_cooperation) dentro del Acuerdo Marco 3-III de la DGD-ITM.
- El trabajo de campo fue financiado por el Centro de Excelencia de Investigación en Malaria de la Amazonia U19AI089681, del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica.

INDICE

INDICE	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ÍNDICE DE TABLAS	iii
ABREVIATURAS	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
1. Introducción	1
2. Marco Teórico	5
2.1 Historia	5
2.2 Ciclo biológico de <i>Plasmodium</i> sp	6
2.3 Gametocitogénesis	9
2.4 La transmisión de la malaria	11
2.5 Detección de gametocitos	11
3. Planteamiento del problema	13
4. Hipótesis	16
5. Justificación	17
6. Objetivos	19
6.1 Objetivo general	19
6.2 Objetivos específicos	19

7. Materiales y métodos	20
7.1 Diseño del estudio	20
7.2 Zona de estudio	22
7.3 Colección de la muestra	23
7.4 Consentimiento Ético	24
7.5 Métodos de Diagnóstico	24
7.5.1 Microscopía	24
7.5.2 Extracción de ADN	25
7.5.3 Diagnóstico de <i>Plasmodium</i> por qPCR	26
7.5.4 Extracción de ARN	26
7.5.5 Digestión de ADN mediante DNAsa	27
7.5.6 Detección de Gametocitos por RT-qPCR	28
7.5.7 Cultivo de Gametocitos	29
7.5.8 Preparación de la curva Estándar	30
8. Análisis Estadístico	33
9. Resultados	36
9.1 Estandarización el método de detección y cuantificación de gametocitos de <i>P. vivax</i> y <i>P. falciparum</i> por RT-qPCR en el Laboratorio de Malaria.	36
9.2 Prevalencia e incidencia de estadios asexuados y gametocitos por <i>P. vivax</i> y <i>P. falciparum</i> por microscopía y qPCR.	38
9.2.1 Prevalencia y densidad de incidencia de estadios asexuados.	38
9.2.2 Prevalencia y densidad de incidencia de estadio gametocito.	40

9.3 Identificación de factores asociados a la gametocitemia en poblaciones de baja transmisión de malaria.	47
9.3.1 Análisis de Regresión de Poisson Multinivel Bivariado.	49
9.3.2 Análisis de Regresión de Poisson Multinivel Multivariado.	53
10. Discusiones	55
11. Conclusiones	64
12. Limitaciones	65
13. Recomendaciones	66
14. Bibliografía	67
15. Anexo	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo biológico de *Plasmodium sp.*

Figura 2. Modelo propuesto para la gametocitogénesis.

Figura 3: Periodo de colecta del Proyecto ICEMR

Figura 4: Esquema de Colecta de muestras.

Figura 5: Localización de las comunidades de estudio.

Figura 6: Esquema de procesamiento de muestras.

Figura 7: A: Esquema del *VarioMACS separator*TM. B: Esquema conteo de cuadrante de cámara de Neubauer.

Figura 8: Gráfico Acíclico Directo (DGA) de Factores asociados a la presencia de gametocitemia.

Figura 9: Curva estándar para la cuantificación de gametocitos.

Figura 10: Evaluación de la eficiencia y correlación del RT-qPCR de Pvs25, mediante el programa LinRegPCR,

Figura 11: Comparación entre la prevalencia de *P. vivax* mediante microscopía (Mx) y qPCR como métodos de diagnóstico (Dx) en los meses de estudio.

Figura 12: Comparación entre la prevalencia de *P. falciparum* mediante microscopía (Mx) y qPCR como métodos de diagnóstico (Dx) en los meses de estudio

Figura 13: Porcentaje total de gametocitos en *P. vivax* detectadas mediante microscopía y RT-qPCR cuando el métodos de diagnóstico fue por PCR diagnóstico.

Figura 14: Porcentaje total de gametocitos en *P. vivax* detectadas mediante microscopía y RT-qPCR cuando el métodos de diagnóstico fue Microscopia

Figura 15: Comparación entre porcentaje de gametocitos en muestras *P. vivax* positivas mediante microscopía y qPCR como métodos de diagnóstico en los meses de estudio.

Figura 16: Comparación entre el porcentaje de gametocitos en muestras de *P. falciparum* positivas mediante qPCR como métodos de diagnóstico en los meses de estudio.

Figura 17: Cambios en el porcentaje de gametocitos en muestras de *P. vivax* positivas mediante qPCR en las dos zonas de estudio.

Figura 18: Cambios en el porcentaje de gametocitos en muestras de *P. falciparum* positivas mediante microscopía y qPCR en las dos zonas de estudio.

Figura 19: Comparación de resultados obtenidos durante el presente estudio y de Barbosa *et al.* (10) en la detección de gametocitos de *P. vivax*.

Figura 20: Comparación entre Individuos con gametocitos detectados por RT-qPCR a *P. falciparum* y *P. vivax* y la presencia de fiebre.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Descripción de la población de estudio incluida para el análisis de factores asociados a gametocitemia.

Tabla 2: Resultados de los factores significativos asociados a la presencia de gametocitos mediante un análisis de regresión de Poisson multinivel bivariado.

Tabla 3: Resultados de los factores significativos asociados a la presencia de gametocitos mediante un análisis de regresión de Poisson multinivel bivariado considerando el criterio de inclusión microscopia positiva.

Tabla 4: Resultados de los factores asociados a la presencia de gametocitos mediante un análisis de regresión de Poisson multinivel multivariado.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AP2-G: Proteína Apicomplexa 2 - Gametocitos

ARN: Ácido ribonucleico

Gametocitemia: Presencia de gametocitos en la sangre,

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa

qPCR: Reacción en cadena de la Polimerasa cuantitativa

PfHda2: *Plasmodium falciparum* histona deacetilasa 2

PfHP1: *Plasmodium falciparum* Proteína Histona 1

Pfs25: *Plasmodium falciparum* Proteína de superficie 25

Pfs16: *Plasmodium falciparum* Proteína de superficie 16

Pfs230: *Plasmodium falciparum* Proteína de superficie 230

Pv25: *Plasmodium vivax* Proteína de superficie 25

RTqPCR: Reacción en cadena de la Polimerasa cuantitativa asociada a
Transcripción Reversa

RESUMEN

Antecedentes: Es esencial entender los factores ambientales y humanos que contribuyen a la presencia de gametocitos para un adecuado diseño de las intervenciones destinadas a la eliminación de la malaria; pero en las zonas de baja transmisión y alta prevalencia de *P. vivax*, que se caracteriza por infecciones de baja densidad, el uso de herramientas moleculares ha permitido detectar más de 90% de infecciones con gametocitos en casos de malaria, a diferencia de la microscopía que no es un método apropiado de diagnóstico para detectar la presencia de infecciones sub-microscópicas de estadios asexuales y gametocitos .

Objetivo: Identificar factores ambientales y humanos asociados a la presencia de gametocitos en áreas de baja transmisión en la Amazonia Peruana mediante métodos de detección molecular.

Materiales y Métodos:

Se realizó un estudio longitudinal de Diciembre 2013 hasta Diciembre 2014 con 5 evaluaciones a 1934 individuos de las poblaciones de San José Lupuna (LUP) y Cahuide (CAH), Provincia de Maynas, Loreto, Perú. Se calculó la prevalencia y densidad de incidencia para los estadios asexuales mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR), todas las muestras positivas fueron posteriormente analizadas para la detección de gametocitos, mediante la transcriptasa reversa – reacción en cadena de la polimerasa (RT-qPCR) usando los marcadores *Pvs25* y *Pfs25* de *P. vivax* y *P. falciparum* respectivamente. Se realizó un análisis de regresión multinivel de Poisson bivariado y multivariado

(PR=Razón de Prevalencia) para identificar los factores asociados a la presencia de gametocitos.

Resultados: La prevalencia de malaria por qPCR fue 10,29%; mientras que la densidad de incidencia anual fue de 0,28 infecciones por persona/año y 0,15 infecciones por persona/año a *P. vivax* y *P. falciparum* respectivamente. La prueba de RT-qPCR detectó gametocitos en el 27,7% de las infecciones por *P. vivax* y en 7,86% de *P. falciparum*. El análisis de regresión de Poisson multinivel dio como resultado que la fiebre (*P. falciparum* PR: 11,41, $p=0,002$ CI [2,48-52,53]; *P. vivax* PR: 3,45, $p<0,001$ CI [2,17-5,48]) y el mes de colecta (*P. falciparum*: aumenta en Setiembre y Diciembre 2014; *P. vivax* disminuye en Setiembre 2014) son factores asociados a la presencia de gametocitos.

Conclusión:

La presencia de gametocitos en los individuos positivos a malaria mediante qPCR está asociado a fiebre y la época seca.

Palabras clave: gametocitemia, malaria, RT-qPCR, Amazonía Peruana

ABSTRACT

Background: Understanding the environmental and human factors that contribute to gametocyte carriage is essential for adequate design of interventions aiming for malaria elimination, but in areas of low transmission and high prevalence of *P. vivax*, characterized by low density infections, the use of molecular methods has allowed detection of more than 90% of gametocyte carriage in cases of malaria, where microscopy is not an appropriate method for diagnostic for the presence of sub-patent infections of asexual and gametocyte stages.

Aim: To identify environmental and clinical associated factors with gametocyte carriage in low transmission areas in the Peruvian Amazon using molecular detection methods.

Method: A longitudinal study from December 2013 to December 2014 with 5 collection time-points was conducted in 1934 inhabitants from San Jose de Lupuna (LUP) and Cahuide, Maynas, Peru. Prevalence and incidence for malaria was determined by Real Time Polymerase Chain Reaction (qPCR). All positive samples were tested for gametocyte detection by Reverse Transcriptase-qPCR (RT-qPCR) using the markers *pvs25* and *pfs25* of *P. vivax* and *P. falciparum* respectively. Univariate and multivariate multilevel regression Poisson analyses were used to identify the associated factors with gametocytemia.

Results: The prevalence of asexual stage of malaria by qPCR was 10,29%, the annual incidence density was 0,28 and 0,15 infection person/year for *P. vivax* and *P. falciparum* respectively. RT-qPCR detected gametocytes in 27,7% of *P. vivax* infections and 7,86% to *P. falciparum*. Multilevel regression analysis show the

fever (*P falciparum* PR:11,41, p=0,002 CI [2,48-52,53]; *P vivax* PR:3,45, p<0,001 CI [2,17-5,48]) and time of collection (*P falciparum*: increase in September y December 2014; *P vivax* decrease in September 2014) as factor associated with gametocytaemia.

Conclusion: The presence of gametocytes in individuals positive to malaria using qPCR is associated with fever and the dry season.

Keywords: Gametocytaemia, Malaria, RT-qPCR, Peruvian Amazon.

1. Introducción

De acuerdo a los reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), para el 2015 la malaria ha afectado alrededor de 214 millones de personas a nivel mundial, causando 438 000 muertes (1). Esta enfermedad tropical, ocasionada por el parásito del género *Plasmodium sp.*, se transmite por la picadura del mosquito hembra del género *Anopheles sp.*, que al momento de picar a un individuo infectado debe absorber al estadio sexual del parásito, denominado gametocito, de otro modo el parásito no podrá cumplir su ciclo biológico y proseguir con la diseminación de la enfermedad (2,3).

El diagnóstico de rutina de malaria se realiza mediante la microscopía (4,5), aunque no es la metodología más adecuada en zonas de baja transmisión como la Amazonía, debido a la presencia de infecciones con parasitemias muy por debajo del límite de detección de un microscopista experto (50 parásitos/ μ l), denominadas infecciones sub-microscópicas (6,7).

En zonas endémicas de baja transmisión, las infecciones sub-microscópicas se presentan por una memoria inmunológica generada como respuesta a las repetidas infecciones con el parásito. Estas infecciones recurrentes brindan control en el incremento de la parasitemia, por tanto solo son detectadas por métodos más sensibles y no por métodos de diagnóstico de rutina (3,8).

Bajo un contexto de baja transmisión donde las infecciones sub-microscópicas representan alrededor del 60% de infecciones totales (5,6,9) es necesario saber si este tipo de infecciones son capaces de transmitir la enfermedad (7,10), para lo cual deben presentar el estadio de gametocito maduro o infectivo, e identificar factores que estén asociados a la presencia de gametocitos para entender mejor la transmisión de la malaria con fines de control y posterior eliminación en la Amazonia Peruana (11,12).

Se sabe que hay ciertas características asociadas a la gametocitogénesis, estos pueden ser factores nutricionales, presencia de drogas, cambios en el pH del hospedero (3,13,14). Estudios previos han reportado factores de riesgo ambientales y clínicos asociados a la presencia de gametocitemia en niños y adultos. En zonas de baja transmisión se ha encontrado asociación entre la edad y la presencia de gametocitos, personas menores de 5 años, presentan mayor cantidad de gametocitos que las personas con mayor edad (4). Karl *et al* reportaron una fuerte asociación entre gametocitemia en niños y presencia de anemia en *P. falciparum*, otro factor fue una baja parasitemia. En *P. vivax* la gametocitemia estaba asociada directamente a la parasitemia de los estadios asexuales, relacionando esta asociación a la rápida producción y maduración del gametocito (3 días) en esta especie. (11). Grande *et al* (15) reportó el agrupamiento de infecciones (“hot spots” o puntos calientes de transmisión) con gametocitos, los cuales permiten que se mantengan las infecciones en áreas específicas, por lo que se sugiere un tratamiento rápido y focalizado para eliminar a estos “hot spots”.

En Perú, la información asociada a la presencia de gametocitos es limitada. Un reporte previo reportó la asociación de la sintomatología con la presencia de gametocitos. En *P. vivax* se encontró que las personas con infecciones con gametocitos presentaban fiebre más alta y una parasitemia mayor a los que no presentaban gametocitos. Por el contrario, en individuos infectados con *P. falciparum*, presentaron menos fiebre los individuos con gametocitemia a diferencia de los que no tenían gametocitos; pero este estudio utilizó microscopía como método de diagnóstico (12).

Al igual que para el diagnóstico de malaria, las herramientas moleculares han permitido aumentar la sensibilidad diagnóstica (8,16–19) y detectar mayor cantidad de casos con gametocitos. Para la detección de gametocitos no se puede utilizar la prueba de PCR basada en la detección del Ácido Desoxiribonucleico (ADN), pues el gametocito y los demás estadios presentan el mismo genoma. Por esta razón la alternativa para la detección específica de este estadio es el Ácido Ribonucleico (ARN) mediante un RT-qPCR, pues el gametocito expresa una gran cantidad de genes específicos de este estadio durante su formación y maduración (20). El blanco utilizado en diversos estudios para la detección de gametocitos es la expresión del gen *pfs25* para *Plasmodium falciparum* y *pvs25* para la detección de *P. vivax* (17–19,21,22). A la fecha, estudios utilizando estos marcadores para la identificación de gametocitos son limitados, pues es una herramienta que recién se está utilizando en estudios epidemiológicos (4,7,10,16,21).

En el presente estudio se utilizó como herramienta de detección de gametocitos un RT-qPCR y se evaluó los resultados para determinar la existencia de alguna asociación con factores humanos y ambientales que podrían influir en la transmisión de la malaria en el transcurso de un año de seguimiento, en dos comunidades consideradas de baja transmisión de malaria de la Amazonia Peruana.

2. Marco teórico

2.1. Historia

Laveran, en 1881, identificó por primera vez el parásito de la malaria (23) detectando elementos característicos en sangre de personas infectadas con malaria. Posteriormente, Osler hizo una descripción de las distintas formas encontradas en pacientes con esta enfermedad (24), dentro de las cuales describe “la forma libre” (actualmente conocida como gametocito) y unas formas exflageladas con 1, 2 o más flagelos.

En 1897, Mac Cullum observó estas formas exflageladas en sangre de cuervo y la fusión de estas con cuerpos no móviles (conocido ahora como ookinete), sugiriendo que ésta sería la fase sexual del parásito (3). A pesar del conocimiento sobre la enfermedad en el siglo XIX, todavía no se tenía claro la forma de transmisión de ésta. En 1883, Albert King presenta la doctrina “mosquito-malaria”, basándose en pruebas colectadas sobre la relación entre mosquito y la malaria, siendo las más resaltantes que la temporada de malaria se corresponde con la abundancia de mosquitos, los países con casos de malaria son adecuados para la cría de mosquitos, similares condiciones protegen contra la malaria y los mosquitos (24).

En 1894, Laveran, Manson y un grupo de malariólogos italianos, estaban convencidos de que el mosquito estaba involucrado en la transmisión de la enfermedad. Sin embargo, fue Ross quien en 1899 demostró que la transmisión de la malaria era a través de mosquitos del género *Anopheles sp.* Adicionalmente

Mac Cullum observó que cuando la sangre de los pacientes infectados con malaria era extraída y se enfriaba, aparecían formas exflageladas, sugiriendo dos etapas en el ciclo de vida del parásito: una en el mosquito y otra en el humano (1).

Estudios posteriores demostraron que la hembra del mosquito del género *Anopheles* era el agente transmisor de la malaria (24). Actualmente se conoce que para que la transmisión de la malaria ocurra, un mosquito hembra del género *Anopheles* debe alimentarse con la sangre de un huésped infectado por gametocitos maduros de *Plasmodium*.

2.2 Ciclo biológico

El ciclo biológico del parásito se completa con la intervención de dos hospedadores, el hombre en el cual se realiza una división asexual y el mosquito hembra del género *Anopheles*, donde se realiza el ciclo sexual del parásito (Ver Figura 1).

Durante el proceso de hematofagia, la hembra de mosquito *Anopheles* inocular los esporozoítos en el hombre. Los esporozoítos infectan las células hepáticas y aquí se multiplican por división asexual, llamada esta fase esquizogonia hepática, produciendo múltiples merozoítos los cuales se encuentran agrupados en una forma denominada esquizonte. Los hepatocitos se rompen cuando los esquizontes han alcanzado su madurez dando lugar a la liberación de merozoítos que son transportados a la circulación general.

Los merozoítos invaden los glóbulos rojos y se desarrollan en su interior formando el estadio de trofozoíto. Los trofozoítos (de forma anular) se dividen de manera asexual creando nuevamente un esquizonte, el cual una vez maduro, se rompe liberando los merozoitos a la circulación general donde invadirán nuevos eritrocitos.

Cuando el parásito lleva a cabo el ciclo eritrocítico, tienen lugar las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Algunos parásitos (merozoitos) se transformarán en gametocitos, proceso denominado gametocitogenesis, cuya maduración se da en la medula ósea y vuelven a salir al torrente sanguíneo en una etapa madura e infectiva. Los gametocitos masculinos (microgametocitos) y femeninos (macrogametocitos) son ingeridos por un mosquito *Anopheles* durante la hematofagia.

La multiplicación del parásito en el mosquito se conoce como ciclo esporogónico. En el estómago del mosquito los microgametos realizan un proceso de exflagelación mediante el cual este se divide en 8 formas capaces de fecundar a otros macrogametocitos y así desarrollan los cigotos. El cigoto se convierte en ooquineto móvil, e invade la pared del intestino y se convierte en ooquiste, generalmente por fuera del estómago. El ooquiste desarrolla en su interior esporozoítos haploides, este ooquiste crece, se rompe y libera otros esporozoítos, que una vez liberados ascienden a las glándulas salivares trilobuladas, donde quedan preparados para ser inoculados con la saliva durante una nueva picadura.

La inoculación de los esporozoítos en una nueva persona perpetúa al parásito de la malaria, con lo cual queda cerrado el ciclo (25).

En este ciclo hay que tener en cuenta que las especies *P. vivax* y *P. ovale* pueden desarrollar, en los hepatocitos, un estadio denominado hipnozoítos o formas “latentes”, los cuales en un momento determinado desarrollan una esquizogonia exoeritrocitaria y liberan nuevamente merozoítos a la circulación sanguínea produciendo nuevas infecciones denominadas relapsos.

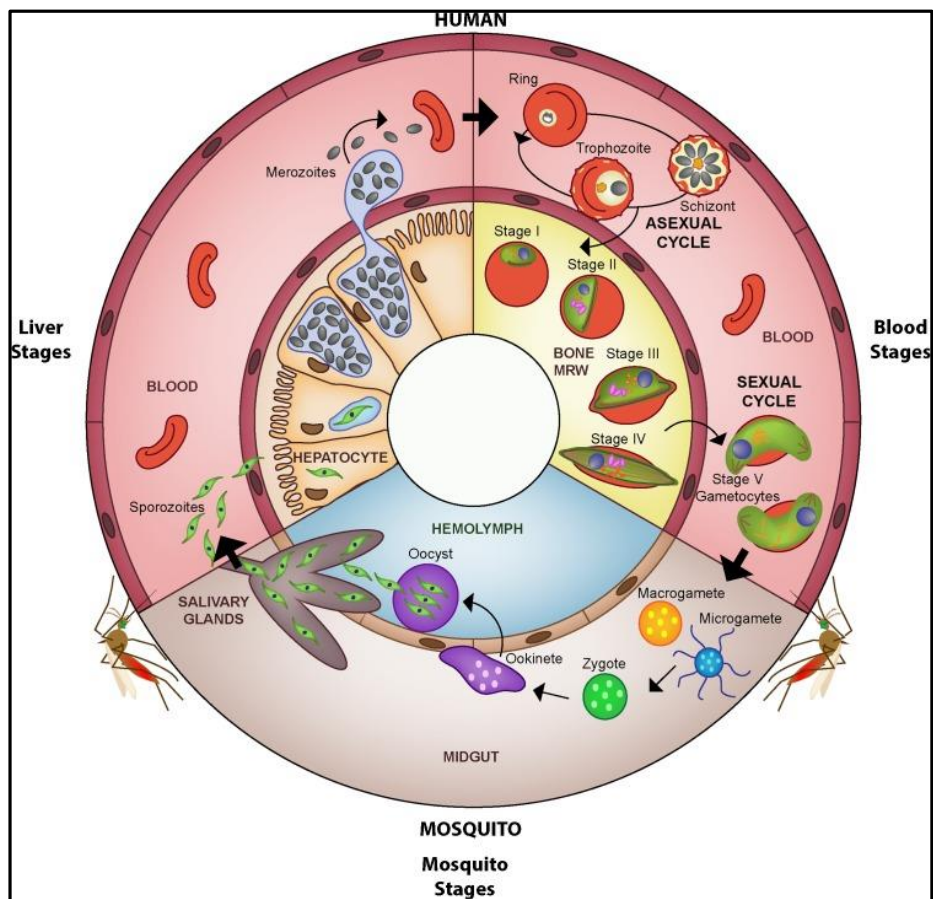


Figura 1: Ciclo biológico de *Plasmodium* sp. (Tomado de Nilsson *et al* (2) con permiso del autor).

2.3 Gametocitogénesis

La gametocitogénesis es el proceso por el cual se da la diferenciación al estadio gametocito del parásito de la malaria, en el cual se puede identificar 5 etapas relacionadas a su tiempo de maduración y es crucial para el proceso de transmisión de la enfermedad (13). Estudios recientes investigando la expresión de genes (2,3,14,26–29), demuestran que el gametocito presenta una gran cantidad de proteínas específicas que solo son expresadas durante la gametocitogénesis y que le permiten sobrevivir en el mosquito y proseguir con la fase sexual.

Aunque la diferenciación del parásito a este estadio puede verse afectada en condiciones de estrés ocasionado por cambios en su medio ambiente tales como pH, temperatura, bajas cantidades de hierro en sangre, la presencia de drogas antimaláricas o señales que pueden ser sentidas y traducidas produciendo cambios rápidos en los patrones bioquímicos (2,3), aunque este proceso no se conoce en detalle si se han identificado algunos genes que estarían relacionados con este proceso.

Recientemente se ha identificado el gen AP2-G que sería el responsable de la cascada que origina la gametocitogénesis, y que en parásitos asexuales permanece epigenéticamente controlado por PfHda2 y PfHP1 (28,30). Un aumento en la expresión de AP2-G probablemente active la expresión de genes tempranos de gametocitos según el modelo propuesto por Kafsack (Ver figura 2).

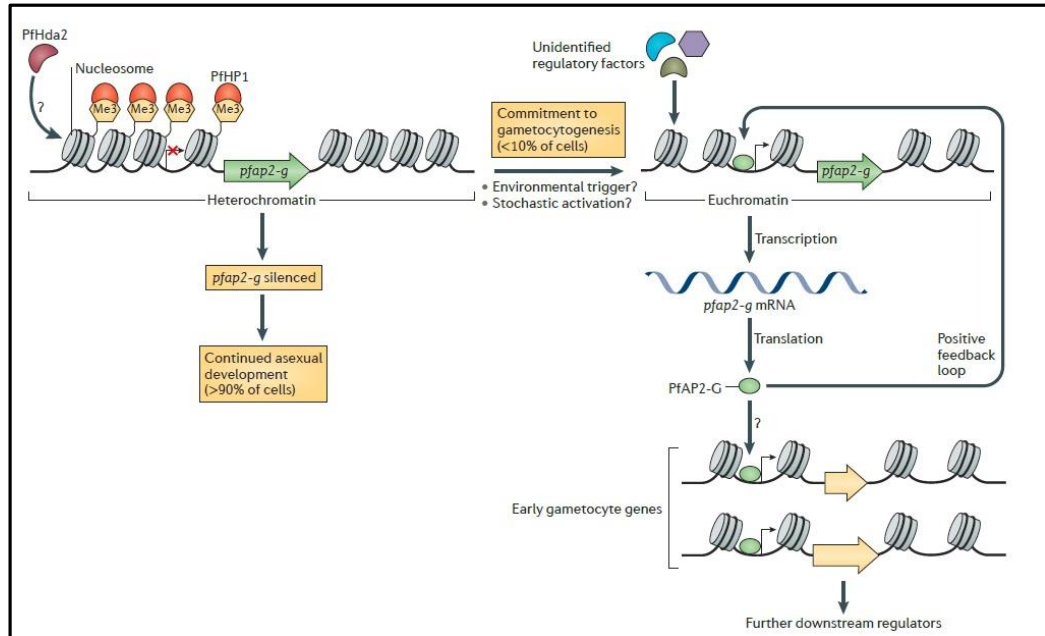


Figura 2. Modelo de regulación de la expresión genética propuesto para la gametocitogénesis (Tomado de Josling *et al* 2015 (13) con permiso de autor).

La gametocitogénesis en *P. falciparum* dura aproximadamente 12 días hasta que el gametocito llega a una etapa madura (etapa V) y sea infectivo para el mosquito. En el caso de *P. vivax*, el periodo de maduración es más corto, tres días después de observar los primeros parásitos asexuados se pueden observar los gametocitos en el torrente sanguíneo (3,4). Previo a esta etapa, el gametocito en proceso de maduración se encuentra secuestrado en el endotelio, y solo cuando llega a su estado maduro se libera al torrente sanguíneo donde puede ser detectado, siendo su vida media de 4-6 días en *P. falciparum* y de 3 días en *P. vivax* (3,4). Durante el proceso de maduración del gametocito se expresan genes específicos para las etapas inmaduras y maduras. Cuando el gametocito llega a su madurez y es liberado al torrente sanguíneo se ha identificado que expresa genes como *pfs25*, *pfs16*, *pfs230*, que codifican proteínas de membrana y que van a permitir continuar con el ciclo en el mosquito (3,14,25).

2.4 La transmisión de la malaria

La malaria es transmitida a través de la picadura del mosquito hembra del género *Anopheles sp*, siendo *Anopheles darlingi* la especie predominante en el Perú (84% del total del género *Anopheles sp*.) (31). Para que el parásito pueda infectar al mosquito y proseguir con su ciclo biológico es necesario la presencia de un gametocito maduro (o etapa V) (3,26). Si el mosquito absorbiera en el momento de la picadura algún otro tipo de estadio o gameto inmaduro, simplemente el parásito no podrá sobrevivir y seguir con su ciclo de vida. Un mosquito hembra puede absorber entre 1-3 μ l de sangre al momento de picar (3,32), pero no se tiene claro la cantidad mínima de gametocitos que debe absorber el mosquito para que pueda transmitir la enfermedad, pues estudios han reportado que es variable y en algunos casos muy baja concentración de gametocitos puede infectar al mosquito (21).

2.5 Detección de gametocitos

La proteína de membrana *Pfs25* es una proteína que se expresa solo en el estadio maduro del gametocito (etapa V), estadio de la fase infectiva, esta proteína está involucrada en la formación del ooquinetto dentro del mosquito (17,28,33,34). A diferencia de otras proteínas que se expresan también durante el estadio V del gametocito como *Pfs16*, la expresión de proteínas diferentes a *Pfs25* se inicia en anillos que están por diferenciarse a gametocitos y en estadios inmaduros de los gametocitos (estadios I, II, III, IV), que no son infectivos al mosquito por lo que no son buen blanco para identificar solamente gametocitos infectivos (3).

La detección de la expresión de este gen y su homólogo en *P. vivax* (*Pvs25*) ha permitido diseñar herramientas para identificar y cuantificar gametocitos en sangre, pudiéndolos diferenciar de los otros estadios con la utilización de técnicas basadas en la detección de ARN (16,17,19,21,35).

3. Planteamiento del problema

La malaria es una enfermedad que afecta la salud y economía en el Perú, que lamentablemente a pesar de los esfuerzos realizados no se ha podido controlar. En 2015 se reportaron más de 60 000 casos, de los cuales más del 90% fueron reportados en el departamento de Loreto (36). Las especies predominantes dentro de la Amazonia son *P. vivax*, que representa el 85% del total de casos, y el 15% restante corresponde a *P. falciparum*, especie que puede ocasionar un cuadro clínico más agresivo (4). En los últimos años la prevalencia de esta enfermedad ha ido en aumento y probablemente la falta de información sobre la dinámica de transmisión de la malaria en la Amazonia Peruana sea uno de los factores más importantes, por lo cual las estrategias de control no han dado los resultados esperados. Además, la Amazonia Peruana es una zona hipo endémica donde la captación pasiva no permite detectar a los pacientes asintomáticos (5), personas que debido a constantes exposiciones al parásito desarrollan tolerancia contra éste parásito dejando de evidenciar los síntomas (8).

En diferentes estudios realizados en la Amazonia Peruana con captación de pacientes de forma activa se ha encontrado una alta prevalencia de individuos asintomáticos infectados con *Plasmodium*; convirtiéndose en potenciales reservorios para la transmisión de la malaria (5,6,9,37). Diversos estudios han demostrado los límites de detección para microscopía están entre un rango de 20 a 50 gametocitos/ μ l, mientras que el uso de pruebas moleculares puede detectar 0.1 parásitos/ μ l, o menos, dependiendo de la cantidad de muestra colectada,

incrementado la detección de infecciones con gametocitos hasta 10 veces en zonas tanto de alta como de baja endemicidad (3,16,17,38). Un diagnóstico inadecuado puede ocasionar potenciales infecciones adicionales, debido a que los gametocitos pueden permanecer varios días en el torrente sanguíneo y contribuir con la transmisión de la enfermedad, aunque faltan estudios que puedan determinar la contribución de bajas gametocitemias en la transmisión de la malaria como es el escenario en la Amazonia Peruana.

Sin embargo, Lin *et al.* (8) menciona que las infecciones sub-microscópicas en zonas hiperendémicas no aportan en gran porcentaje a la transmisión de la malaria y son los asintomáticos con altas parasitemia los que mantienen la prevalencia de la enfermedad en estas zonas; pero no menciona un escenario de baja transmisión como en la Amazonia Peruana, donde un gran porcentaje de infecciones son sub-microscópicas.

Debido a la presencia de un gran número de infecciones asintomáticas y sub-microscópicas en la Amazonia Peruana, utilizar microscopía como herramienta para la detección de gametocitos de *Plasmodium* sp. no sería la más adecuada. Se necesitarían métodos más sensibles como el RT-qPCR para detectar y cuantificar gametocitos, lo que podría darnos una mayor precisión para determinar los posibles reservorios para la transmisión de la enfermedad.

En el Perú la información en este tema limitada por lo que en el presente estudio evaluará la asociación entre la presencia de gametocitos detectados con RT-qPCR

con factores ambientales y humanos para determinar si existe diferencias entre dos zonas que presentan diferente prevalencia de malaria. Las muestras que se utilizaran fueron colectadas por captación pasiva y búsqueda activa desde el mes de Diciembre del 2013 a Diciembre del 2014 y permitirán realizar el diagnóstico por microscopía y qPCR para detección de malaria, y RT-qPCR para detección de gametocitos.

4. **Hipótesis**

Existen factores ambientales y humanos asociados a la presencia de gametocitemia en poblaciones de baja transmisión de malaria en la Amazonia Peruana.

5. Justificación

Aunque los gametocitos son el estadio de *Plasmodium sp.* necesario para que se produzca la transmisión de esta enfermedad, lamentablemente no se conoce de factores asociados a la presencia de gametocitos que influyan en la transmisión de la enfermedad en el Perú. La detección de gametocitos se realiza mediante microscopía al momento del diagnóstico de malaria, pero la microscopía no es una técnica útil para el diagnóstico de estadio asexuados y sexuales en la Amazonia debido a la gran cantidad de infecciones sub-microscópicas que circulan en esta área (5,6). Más aún, los gametocitos representan aproximadamente el 5% del total de la parasitemia, convirtiendo la detección mediante esta técnica en prácticamente nula (3,7,10). Es por tanto una necesidad el uso de técnicas más sensibles para la detección como la reacción de la RT-qPCR, la cual ha demostrado la capacidad de detectar en más del 90% de casos positivos la presencia de gametocitos en *P. vivax* (4,10,38).

De estudios realizados en África y Asia en *P. falciparum* se conoce que la respuesta inmune y la edad influyen en el incremento del porcentaje de gametocitos en la parasitemia y que una parte importante de la transmisión de esta enfermedad la producen los adultos (3,8,39,40). Factores clínicos como la anemia, variantes de hemoglobina C y S y el grupo sanguíneo O ó B están asociados a la gametocitemia en zonas de alta transmisión (3,11,15). En la Amazonia Peruana, que es una zona de baja transmisión, se desconoce si la dinámica es similar a lo reportado en estudios en zonas de baja transmisión como en las Islas Solomon (38)

o Remasinho (10). Por lo cual es importante realizar estudios que nos permitan determinar el aporte de la presencia de gametocitos en la propagación de la enfermedad para que se puedan aplicar las estrategias adecuadas para el control de la malaria.

6. Objetivos

6.1. Objetivo general

Identificar la asociación de la gametocitemia de *P. vivax* y *P. falciparum* a factores ambientales y humanos en áreas de baja transmisión de malaria en la Amazonia Peruana

6.2. Objetivos específicos

- Estandarizar el método de detección de gametocitos de *P. vivax* y *P. falciparum* por RT-qPCR en el Laboratorio de Malaria.
- Evaluar la prevalencia e incidencia de estadios asexuados y gametocitos por *P. vivax* y *P. falciparum* por microscopía y qPCR en una cohorte de 2000 individuos durante el periodo de un año.
- Evaluar los factores asociados a la gametocitemia en poblaciones de baja transmisión de malaria en la Amazonia Peruana.

7. Materiales y Métodos

7.1 Diseño del Estudio

Este estudio es parte del Centro Internacional de Excelencia en Investigación en Malaria (ICEMR de sus siglas en Ingles). El estudio del ICEMR es una cohorte longitudinal que incluyó un seguimiento mensual desde Agosto 2012 hasta Diciembre 2015 en 2 comunidades de la provincia de Maynas, San José de Lupuna y Cahuide. Mensualmente se realizó una encuesta socio-demográfica, se colectaron dos láminas y una muestra de 80 ul aproximadamente de sangre papel filtro, para el diagnóstico microscópico y diagnóstico por la prueba de PCR respectivamente, el diagnóstico microscópico se realizó mensualmente, mientras que el diagnóstico molecular se realizó trimestralmente como se muestra en la figura 3.

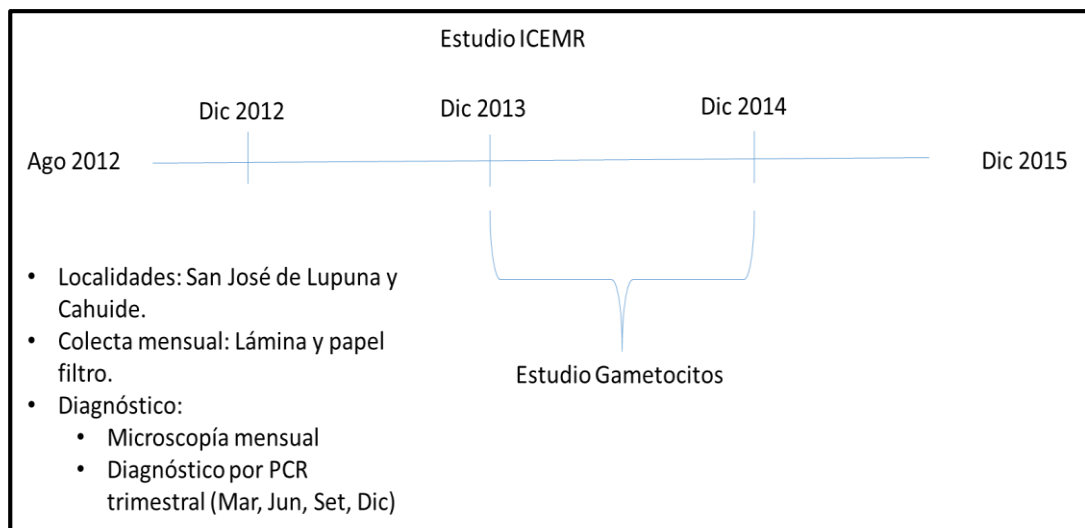


Figura 3: Periodo de colecta del Proyecto ICEMR.

La toma de muestras para el presente estudio se realizó desde Diciembre 2013 hasta Diciembre 2014 en ambas comunidades, la captación fue de forma activa y pasiva. Las muestras que se incluyeron en este estudio fueron muestras positivas por qPCR para ambas especies, como solo se realizó el diagnóstico molecular cada 3 meses, el estudio contó con muestras de los meses de Diciembre 2013, Marzo, Junio, Setiembre y Diciembre del 2014. En todas las muestras positivas al diagnóstico por qPCR del estudio se le realizó la extracción de ARN a partir de sangre total y posteriormente la detección de gametocitos se realizó mediante transcriptasa reversa qPCR (RT-qPCR), los resultados obtenidos fueron analizados de acuerdo a los objetivos del estudio.

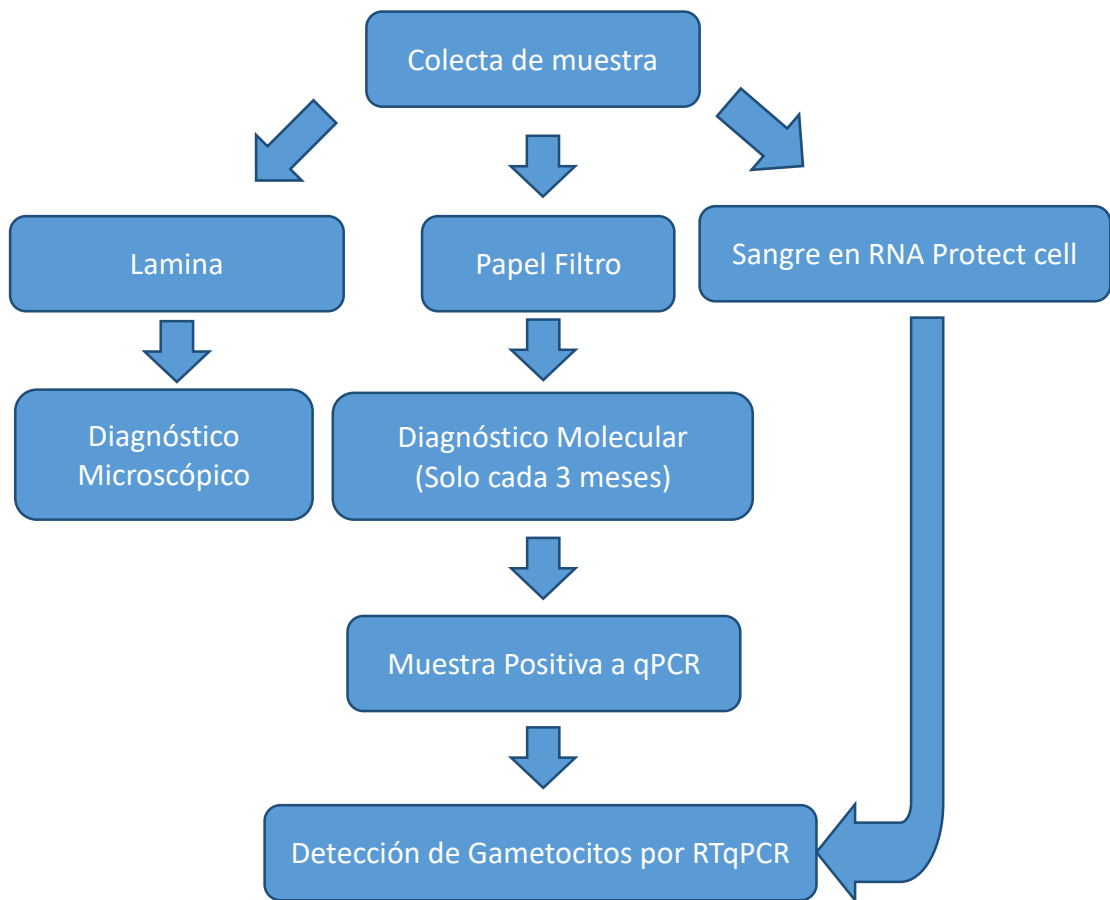


Figura 4: Esquema de Colecta de muestras.

7.2 Zona de Estudio

Este estudio fue realizado en dos comunidades cerca de la ciudad de Iquitos, en la provincia de Maynas, departamento de Loreto: Cahuide (CAH) y San José de Lupuna (LUP) (Figura 5). Ambas comunidades cuentan con una población aproximada de 2 000 habitantes, tienen su pico de prevalencia de malaria en el mes de Marzo y disminuye en los siguientes meses. En Cahuide la prevalencia de malaria llega al 12% como máximo, y puede disminuir hasta 6%. En el caso de San José de Lupuna la prevalencia de malaria llega al 26% en el mes de Marzo y disminuye hasta 12% en los siguientes meses (datos obtenidos del estudio ICEMR). La comunidad de San José de Lupuna se encuentra a 10 Km de la ciudad de Iquitos, cruzando el río Nanay, única vía de acceso, mientras que la comunidad de Cahuide se encuentra a aproximadamente a 57 km del centro de Iquitos, en la intersección de la carretera Iquitos-Nauta con el río Itaya.

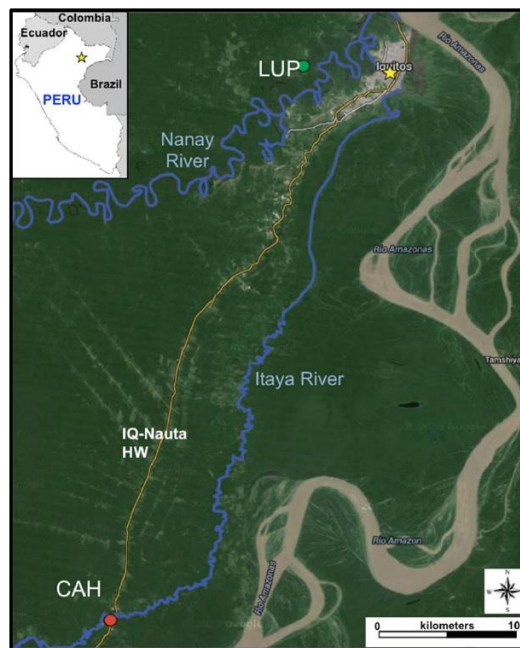


Figura 5: Localización de las comunidades de Estudio. LUP: San José de Lupuna, CAH: Cahuide. (Tomado de Moreno *et al.* (31) con permiso de autor)

7.3 Muestras

Como parte del Proyecto: **“Impacto de los portadores asintomáticos en la Epidemiología y control de la malaria en la Amazonia Peruana”**, registrado en la Universidad Peruana Cayetano Heredia con **código SIDISI 57395**, se realizó 5 evaluaciones a 1934 individuos durante el periodo de Diciembre 2013 a Diciembre del 2014 por captación activa mediante intervenciones mensuales en las dos zonas de estudio donde se trató de captar a la totalidad de la población de la comunidad colectando un total del 7251 muestras.

A todas las personas que aceptaron participar en el estudio se les formuló una encuesta socio demográfica y una punción dactilar para la toma de muestra para preparar dos laminas que incluye un extendido y una gota gruesa en cada lamina para el diagnóstico microscópico, además se embebió un papel filtro para la posterior extracción de ADN y 3 gotas (~50-60 µl) de sangre que fueron almacenada en RNA Protect Cell Reagent (Qiagen ®) para la extracción de ARN. Una vez en el laboratorio las muestras fueron almacenadas en condiciones adecuadas, el papel filtro se almacenó a -20°C, mientras que la muestra de sangre en RNA Protect Cell Reagent (Qiagen ®) se almacenó a -80°C. Para este estudio solo se consideraron las muestras positivas por qPCR para ambas especies.

7.4 Consentimiento Ético

A todas las personas que participaron en el estudio se les informo sobre el objetivo del estudio, la toma de muestra y el uso de estas para ensayos posteriores. Después que aceptaron participar, todas las personas mayores de edad firmaron el consentimiento informado. En el caso de menores de edad, los padres firmaron el consentimiento informado autorizando al menor a participar en el estudio, y los menores firmaron un asentimiento informado. Ambos documentos, consentimiento y asentimiento informado, fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

7.5 Diagnóstico

7.5.1. Microscopía

Las láminas de sangre fueron teñidas con Giemsa siguiendo el procedimiento estándar del Ministerio de Salud (41). Se usó un aumento de 1000 X para leer la gota gruesa. Los trofozoítos y gametocitos se reportaron por separado. Se leyó el número de campos microscópicos necesarios hasta contar por lo menos 500 glóbulos blancos, antes de diagnosticar a un individuo como negativo. La densidad de parásitos de cada especie (parásitos / μ L) se determinó por el número de especies de parásitos (trofozoítos y gametocitos contados por separado), multiplicado por 6 000 (recuento medio estimado de leucocitos por microlitro de sangre) y luego dividido por el número total de glóbulos blancos contados.(41)

7.5.2. Extracción de ADN

La extracción del ADN se realizó utilizando el kit de purificación comercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen®) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Se cortó un cuadradito de aproximadamente 4 mm de lado del papel filtro impregnado con sangre y se puso en un microtubo de 1.5 ml, se agregó 180 µl de buffer ATL (contiene dodecil sulfato de sodio, utilizado para la lisis celular) y se incubó a 80°C por 10 min, luego se agregó 20 µl de proteinasa K y se incubó por 1 hora a 56°C en agitación constante. Posteriormente se agregó 200 µl de buffer AL (contiene hidrocloreuro de guanidina 40%, utilizado para la desnaturalización de proteínas y para permitir la fijación del ADN a la membrana de sílica) y se incubó por 10 min a 70°C en agitación constante. Se agregó etanol absoluto a la mezcla anterior y se pasó a la columna “QIAamp Mini spin column”, se centrifugó a 8000 rpm por 1 min, se agregó 500 µl de buffer AW1, (contiene hidrocloreuro de guanidina 60%, utilizado para la desnaturalización de proteínas y permitir que estas pasen a través de la columna) se centrifugó a 8000 rpm por 1 min y se agregó el buffer AW2 (contiene tris-base, utilizado para remover sales). Finalmente se agregó 50 µl de buffer AE (contiene Tris H-Cl y EDTA para la preservación del ADN), se dejó a temperatura ambiente por 1 minuto y se centrifugó a 8000 rpm por 1 min, el eluido se guardó a -20°C hasta su uso.

7.5.3. Diagnóstico de *Plasmodium* sp. por qPCR

El diagnóstico molecular se realizó de acuerdo al protocolo reportado por Mangold *et al* (23) y adaptado en el laboratorio de Malaria utilizando PerfeCTa® SYBR® Green FastMix® (Quantabio®). Este protocolo se basa en un PCR en tiempo real que utiliza Sybr Green como agente intercalador para la detección del producto de amplificación formado. Los cebadores usados son el PLF1 5'-TAA CGA ACG AGA TCT TAA-3' y PLF2 5'-GTT CCT CTA AGA AGC TTT-3', los cuales detectan la subunidad 18S ribosomal y permiten identificar *P. vivax*, *P. falciparum* en una misma reacción debido a que los cebadores se hibridan a una zona conservada entre las 2 especies; pero que internamente presenta variaciones en la secuencia de amplificación que permite diferenciar cada una de estas especies por la temperatura de fusión (o *Tm de sus siglas en Ingles*) específica para cada especie.

7.5.4. Extracción de ARN

La extracción del ARN se realizó utilizando el kit de extracción de RNA comercial RNeasy Mini Kit (Qiagen®) siguiendo las instrucciones del fabricante. La muestra se centrifugó a 14000g por 20 minutos, luego se descartó el sobrenadante y se guardó el pellet (cuando no se observó el pellet se dejaron 40 µl de volumen del sobrenadante). Al pellet se le agregó 600 µl de buffer RLT (contiene altas concentraciones de isotiocianato de guanidina, que permite una mayor unión a la membrana de sílica) y se llevó a agitación por 10 minutos.

Después de la agitación se agregaron 600 µl de etanol al 70% y se mezcló. Posteriormente, se traspasó la mezcla a la columna “RNeasy spin column” y se centrifugó a 9000g por 15 segundos (s), se eliminó el eluido y se agregó 700 µl de Buffer RW1 (contiene sales de guanidina y etanol, utilizado para remover moléculas, carbohidratos, proteínas y ácidos grasos), se centrifugó a 8000g por 15 s. Después de este paso, se eliminó el eluido y se agregaron 500 µl de Buffer RPE (utilizado para remover trazas de sales), se centrifugó a 9000g por 15 s. y se eliminó el eluido. Se realizó un segundo lavado agregando nuevamente 500 µl de Buffer RPE, se centrifugó por 2 min a 9000g. Para eliminar algún residuo del buffer, se realizó una centrifugación adicional a 14000g por 1 minuto. Posteriormente se agregó 50 µl de agua libre de RNAsa en el centro de la columna, se dejó reposar por 1 min y luego se centrifugó a 9000g por 1 min. Para una mayor obtención de RNA se reusó el eluido y se agregó nuevamente en la columna para una segunda elusión. Se separaron 25 µl de este eluido para la digestión con DNAsa y el volumen restante se guardó a -80°C.

7.5.5. Digestión de ADN mediante DNAsa

La digestión se realizó usando la DNase Ambiom®, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se agregaron a los 25 µl de RNA, 5 µl en total del mix de DNAsa (3µl de buffer 10X, 1 µl de la enzima DNAsa I y 1 µl de agua libre de DNAsas,) en dos partes de 2.5 µl cada una. Se agregaron 2.5 µl del mix de DNAsay se incubó por 30 min a 37°C, luego se agregaron 2.5 µl adicionales del mix de DNAsa y se incubó nuevamente a 37 C por 30 minutos. Finalmente se agregaron

3 µl de la solución inactivadora (contiene EDTA, sustancia quelante que inactiva a la DNAsa) de DNAsa y se incubó por 5 min a temperatura ambiente, luego se centrifugó a 14 000g y se traspasó el sobrenadante a un nuevo tubo. Se guardó la muestra a -80°C hasta su uso.

7.5.6. Detección de Gametocitos por RT-qPCR

La detección e identificación de gametocitos se realizó de acuerdo a lo reportado por Wampfler *et al* (17), el cual se basa en la detección de la expresión de genes *pfs25* y *pvs25* para *P. falciparum* y *P. vivax* respectivamente. La reacción se realizó con ARN, se realizó la transcripción reversa y PCR en una sola reacción utilizando el kit LightCycler MultiPlex RNA virus Master (Roche®). En todos los casos la muestra se analizó por duplicado y se tuvo un control negativo de Transcriptasa Reversa (-RT) para detectar la presencia de ADN genómico. Se utilizó como control muestra de cultivos de gametocitos con concentración conocida, para evaluar las variaciones que podría ocurrir entre placas. La curva estándar se realizó por triplicado en la primera placa del día, mientras que en las demás placas que se realizaron ese día se usó un punto de la curva para normalizar. Todas las placas contaron con un control negativo. Para considerar una muestra positiva se evaluó el resultado del *Ct* (ciclo umbral de sus siglas en inglés) del -RT de cada muestra para confirmar que la amplificación detectada era por presencia de ARN y no ADN remante en la muestra, si este fue mayor o igual al de la muestra que contenía la enzima RT, no se consideró válido y fue repetida.

7.5.7. Cultivo de Gametocitos

La sincronización de cultivos de *P. falciparum* al estadio gametocito se realizó en el Instituto de Medicina Tropical de Amberes utilizando la cepa 3D7-E5, cepa que produce gran cantidad de gametocitos naturalmente, y de acuerdo al protocolo reportado por Fivelman *et al* (42). Brevemente, la sincronización de cultivo para obtener gametocitos se inicia en el día -2, cuando el cultivo se encuentre en estadio de anillo a una parasitemia del 8 -10% (% de parasitemia = [cantidad de glóbulos rojos infectados/número de glóbulos rojos totales (infectados y sin infectar)] x 100), al cultivo en estadio de anillos se le indujo a estrés utilizando 1/3 del volumen total de medio de cultivo completo antiguo (medio retirado del cultivo al momento de hacer el cambio de medio) y se completaron los 2/3 del volumen total restantes con medio de cultivo completo nuevo. Al día siguiente (día -1) la gran mayoría de los parásitos estaban en estadio esquizonte, la parasitemia se llevó al 2% y se agregó 1/3 del volumen total de medio completo antiguo y se completaron los 2/3 restantes del volumen total con medio completo nuevo. Al siguiente día (día 0), se cambió el medio del cultivo por medio completo nuevo. Pasado un día (día 1) se reemplazó el total del medio por medio completo suplementado con N- acetil glucosamina (permite eliminar los parásitos en estadios de anillo restantes), este medio se utilizó por los siguientes 12 días (día 1 al día 12) para mantener a los parásitos y obtener gametocitos maduros (estadio V). Durante todo este periodo se realizó un extendido diario del cultivo sobre una lámina, el cual se coloreó mediante tinción de Giemsa para observar por microscopía la evolución y maduración de los gametocitos en cultivo.

7.5.8. Preparación de la curva Estándar

Cuando se observaron los gametocitos maduros (estadio V), se procedió a la purificación de los mismos mediante el uso de una columna *VarioMACS* en un separador *VarioMACS separator*TM (MACS Miltenyl Biotec®) (Figura 7a). El separador *VarioMACS* es un magneto potente que genera un campo magnético fuerte sobre la columna *VarioMACS*, lo suficiente para retener células. En el caso de los gametocitos de *P. falciparum*, contienen especies paramagnéticas de Fe(III), lo cual genera una alta afinidad a la columna (43) lo que permite concentrar la cantidad de gametocitos.

Todos los estadios, distintos a gametocitos que hayan podido permanecer durante el cultivo, pasaran por la columna. Posteriormente se retiró la columna *VarioMACS* del *VarioMACS separator*TM para que el campo magnético generado por el *VarioMACS separator*TM no afecte a la columna *VarioMACS*, ni a las especies paramagnéticas de Fe(III) del gametocito, permitiendo que mediante el uso de un eluyente como el PBS-BSA 2% permita la liberación de los gametocitos de la columna. Una vez obtenido los gametocitos concentrados, se procedió a una cuantificación mediante un conteo en una cámara de Neubauer.

Para realizar el conteo de gametocitos en la cámara de Neubauer, se realizó una dilución de 1/200 de 50 µl de suspensión de gametocitos, se agregó 10 µl de suspensión en la cámara, luego se cubrió con un portaobjetos y se hizo el conteo a

un aumento de 40X. La lectura se realizó en los 5 cuadrantes grandes, que equivalen a un volumen de 0.1 μl . (Figura 7B).

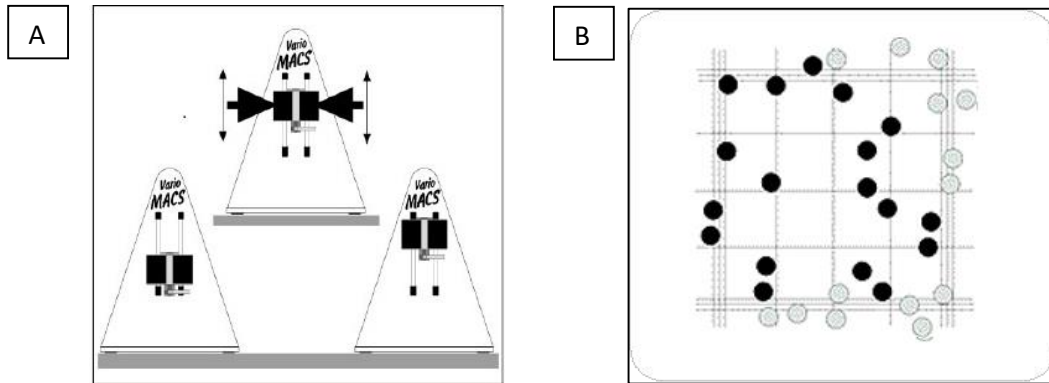


Figura 7: A: Esquema del *VarioMACS separator*TM (<http://www.ebiotrade.com/>). B: Esquema conteo de cuadrante de cámara de Neubauer (Ref: <http://www.celeromics.com/>). Se consideró para el recuento de gametocitos los que estaban dentro del cuadrante, así como aquellos que estaban en la parte superior y los bordes izquierdos (puntos negros); no se consideró contar los gametocitos en los bordes inferior y derecho (puntos grises).

Luego se realizó una dilución con sangre total para ajustar concentración de los gametocitos a 100000 gametocitos/ μl , posteriormente se realizaron diluciones seriadas con sangre total hasta llegar a una concentración de 0.1 gametocitos/ μl . Finalmente, a cada alícuota (50 μl) se le agregó 250 μl de RNA Protect Cell Reagent (Qiagen®) y se llevaron a almacenar a -80 C hasta el momento de la extracción de ARN.

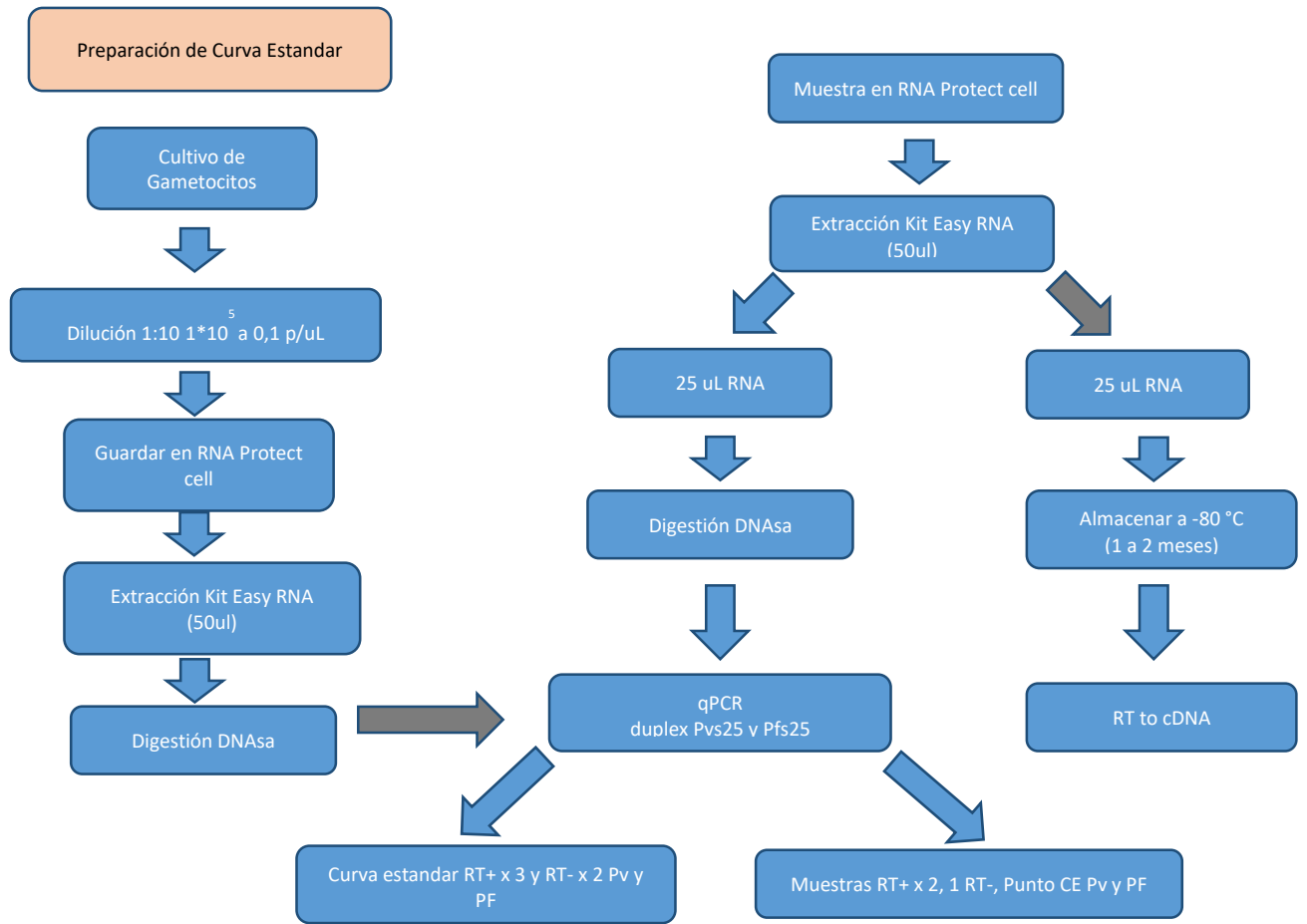


Figura 6: Esquema de procesamiento de muestras

8. Análisis Estadístico

Los resultados del RT-qPCR fueron analizados en el software LightCycler480 v1.5 (Roche ®) además se utilizó este software para evaluar la eficiencia y correlación de amplificación de la curva estándar de los gametocitos de *P. falciparum*, debido a la falta de una curva estándar para *P. vivax* para evaluar la eficiencia y correlación en la amplificación de Pvs25, se utilizó el programa LinRegPCR que permite evaluar la amplificación del producto de PCR mediante el monitoreo de la formación del producto. (44)

La información recolectada fue ingresada en Excel 2010 (Microsoft ®) y se utilizó, para todos los análisis, el software STATA V.13.

De los 1934 individuos que se evaluaron en este estudio, se logró captar el 75% de muestras esperadas (n=7251), aunque se perdió un 25% de muestras, el poder estadístico del estudio se mantuvo por encima del 80%.

Se determinó la prevalencia y densidad de incidencia de los casos positivos durante el estudio y se comparó la prevalencia entre puntos usando el test de McNemar para datos pareados para determinar si existen diferencias significativas entre ellos. Además, se comparó la prevalencia y densidad de incidencia de gametocitos entre localidades para determinar si existe diferencia significativa entre ellos.

Para determinar la existencia de los factores asociados a la gametocitemia, se consideraron solo las muestras positivas por qPCR a malaria (*P. falciparum* y *P. vivax*) y se utilizó un análisis de regresión de Poisson multinivel bivariado y multivariado utilizando el comando “meqrpoisson” que pertenece a la familia binomial y linaje log del software Stata V.13. Se evaluó los valores de la razón de prevalencia (*PR de sus siglas en ingles*) para medir los factores asociados a la presencia de gametocitos. Este tipo de análisis considera que grupos con similares características pueden tener diferencias dentro del mismo grupo o entre grupos similares (correlación interclase), esto permite generar niveles (ejm: un grupo de personas pueden generar un nivel mayor como casa, un grupo de casas genera un distrito, y así sucesivamente) (45,46). Para el presente estudio se consideraron 4 niveles, nivel muestra, nivel individuo, nivel casa y nivel comunidad.

Para el análisis de regresión de Poisson multinivel bivariado se consideraron como factores asociados el mes de colecta, edad, género, comunidad, gestante, episodio previo de malaria y fiebre. Se consideraron resultados significativos valores mayores a $p < 0,1$, lo cuales fueron ingresados al análisis de regresión de Poisson multinivel multivariado para determinar el modelo final, para el análisis multinivel se consideró un $p < 0,05$ como significativos.

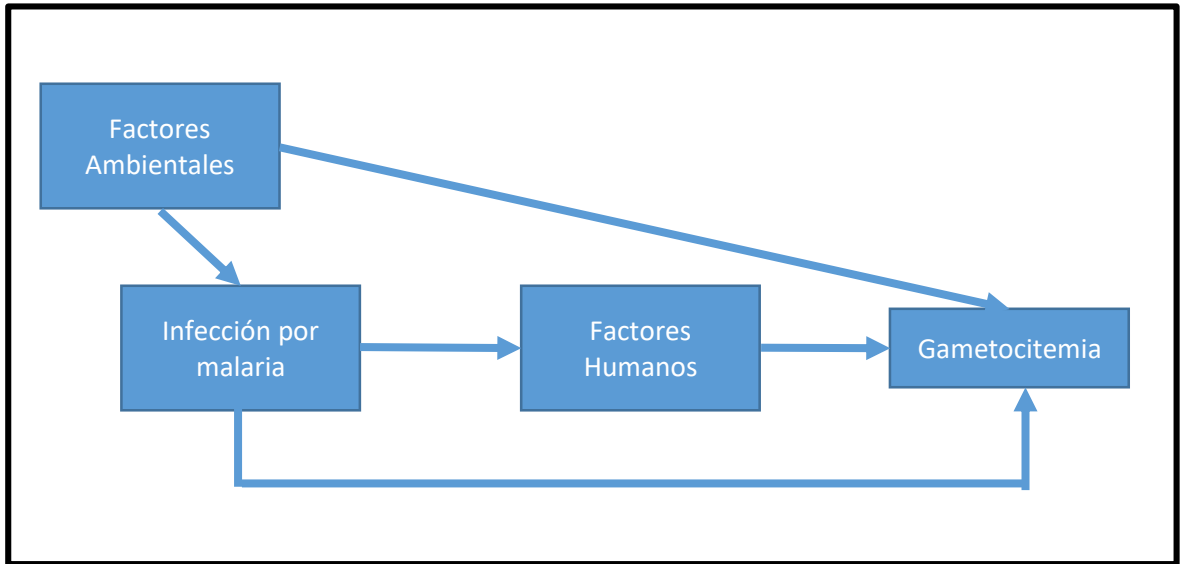


Figura 8: Gráfico Acíclico Directo (DGA) de Factores asociados a la presencia de gametocitemia

9. Resultados

9.1. Estandarización del método de detección y cuantificación de gametocitos de *P. vivax* y *P. falciparum* por RT-qPCR.

En el Laboratorio de Malaria de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH) se realizó el procedimiento previamente reportados por Wampfler *et al.* (17) con muestras de cultivo de gametocitos de *P. falciparum* con una concentración inicial de 100000 gametocitos/ μ l de sangre y diluciones seriadas hasta llegar a 0.1 gametocitos/ μ l, luego los resultados comparados con los resultados del protocolo estandarizado en el Instituto de Medicina Tropical de Amberes (ITM), utilizando muestras de cultivo de gametocitos producidas en el ITM. Además, estas muestras sirvieron como referencia para la curva estándar que se utilizó para la determinar el nivel de detección del RT-qPCR. El límite de detección cuantificable para gametocitos fue de 0,1 gametocitos/ μ l, límite similar al detectado en el ITM, lo que equivale a 87,05 copias del transcrito de acuerdo a lo publicado por Koepfli *et al.* (4), Wampfler *et al* (17) y pruebas realizadas por el grupo del laboratorio (datos no publicados). Además, se consiguió una eficiencia cercana a 100% (Donde el 100% de eficiencia de la reacción equivale a 2). Por debajo de este límite cuantificable, las muestras Se consideraron como <0.1 gametocitos/ μ l. (Figura 9).

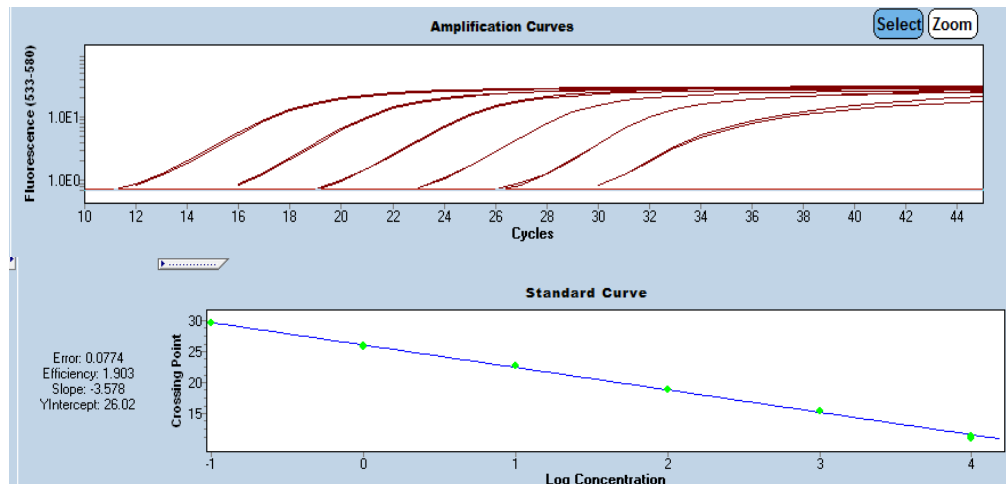


Figura 9: Curva estándar para la cuantificación de gametocitos. Punto -1: 0,1 parásitos/ μ l, Punto 0: 1 parásitos/ μ l, Punto 1: 10 parásitos/ μ l Punto 2: 100 parásitos/ μ l, Punto 3: 1000 parásitos/ μ l, Punto 4: 10000 parásitos/ μ l. Software LightCycler480 v1.5 (Roche ®)

Para el caso de *P. vivax*, se utilizó la muestra con mayor parasitemia detectada por microscopia (820 gametocitos/ μ l), se realizó doble lectura por microscopia para confirmar la parasitemia, luego se realizaron diluciones seriadas del RNA extraído de esta muestra para determinar el límite de detección para *P. vivax*, dando como resultado un límite de detección de 0.82 gametocitos/ μ l (figura 10). Los resultados mostraron que la eficiencia de la reacción fue cercana al 100% indicando que la reacción de amplificación fue adecuada (incremento en 2 veces el amplicón en cada ciclo) , y el coeficiente de correlación para las 6 muestras analizadas estuvo por encima de 0.99, indicándonos que el proceso de amplificación es eficiente para Pvs25.

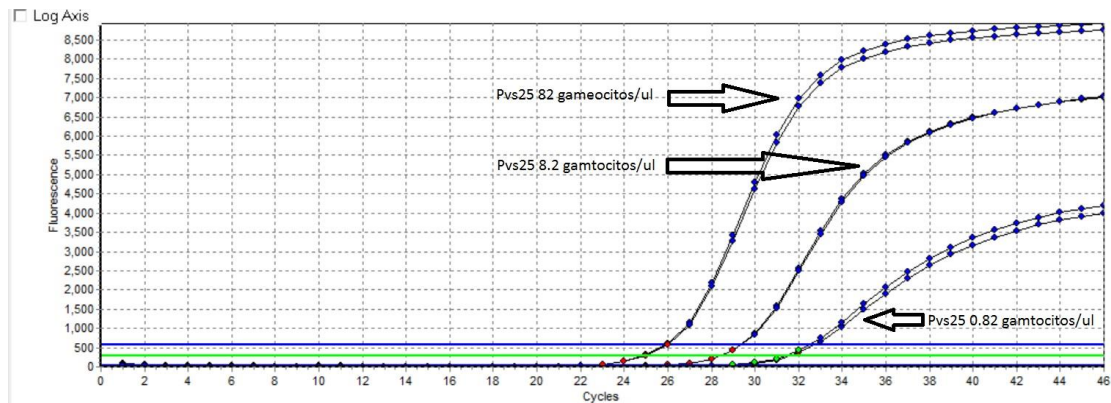


Figura 10: Evaluación de la eficiencia y correlación del RT-qPCR de *pvs25*, mediante el programa LinRegPCR, se utilizaron muestras de 82, 8,2, 0,82 y 0,082 gametocitos/ μ l. El RT-qPCR no pudo detectar la dilución de 0.082 gametocitos/ μ l.

9.2 Prevalencia y densidad de incidencia de estadios asexuados y gametocitos de *P. vivax* y *P. falciparum* por microscopía y qPCR.

9.2.1 Prevalencia y densidad de incidencia de estadios asexuados.

Durante el presente estudio se logró captar en total 7251 muestras (Diciembre 2013=1645 individuos, Marzo 2014=657, Junio 2014=1644, Setiembre 2014=1648, Diciembre 2014=1657). La prevalencia de malaria mediante microscopía fue del 2,23% (261/7251), siendo 5 muestras positivas a *P. falciparum* y 156 muestras positivas a *P. vivax*. Por otro lado, el diagnóstico por qPCR detectó un 10,29% (745/7251) de muestras positivas, de los cuales 229 muestras fueron positivas a *P. falciparum* y 516 muestras fueron positivas a *P. vivax*. Se observó en el caso de *P. vivax* que el diagnóstico por qPCR detectó una mayor prevalencia en el mes de Setiembre, a diferencia del diagnóstico por microscopia, que la mayor prevalencia fue en Junio. (Figura 11). Solo se encontró diferencia significativa en la prevalencia por qPCR entre los meses de Marzo y Junio

($p=0.037$), el resto de meses no fue significativa diferencia en la prevalencia por qPCR.

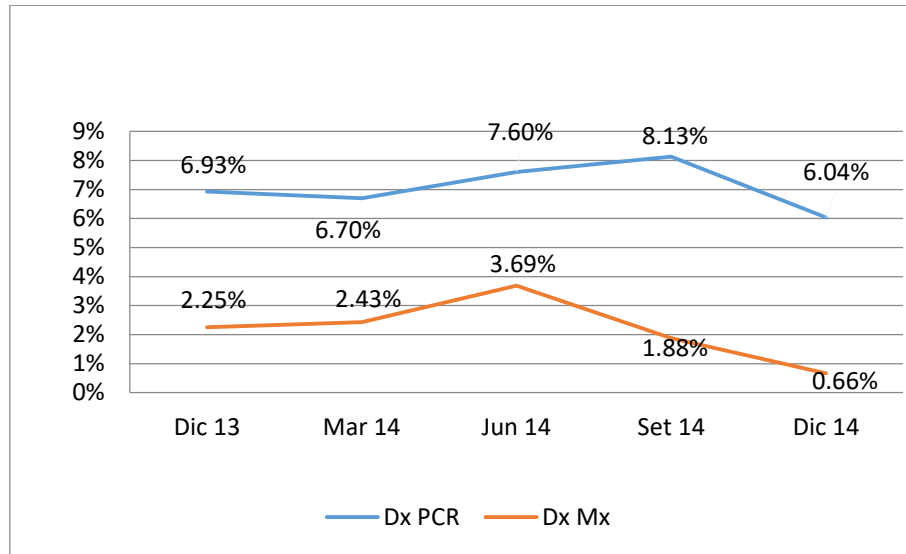


Figura 11: Prevalencia de *P. vivax* mediante microscopía (Dx Mx) y qPCR (Dx qPCR) como métodos de diagnóstico (Dx) por mes de estudio.

Para el caso de *P. falciparum*, el qPCR muestra una mayor prevalencia en el mes de marzo, a diferencia del resultado de microscopía que muestra una mayor prevalencia en el mes de Junio (Figura 12). A diferencia de *P. vivax*, en *P. falciparum* se encontró diferencia significativa entre las prevalencias en más de 1 mes. Se encontró entre los mes de Marzo y Junio ($p<0.01$), Junio y Setiembre ($p<0.01$) y Setiembre y Diciembre 14 ($p<0.04$) cuando se utilizó qPCR para el diagnóstico de malaria

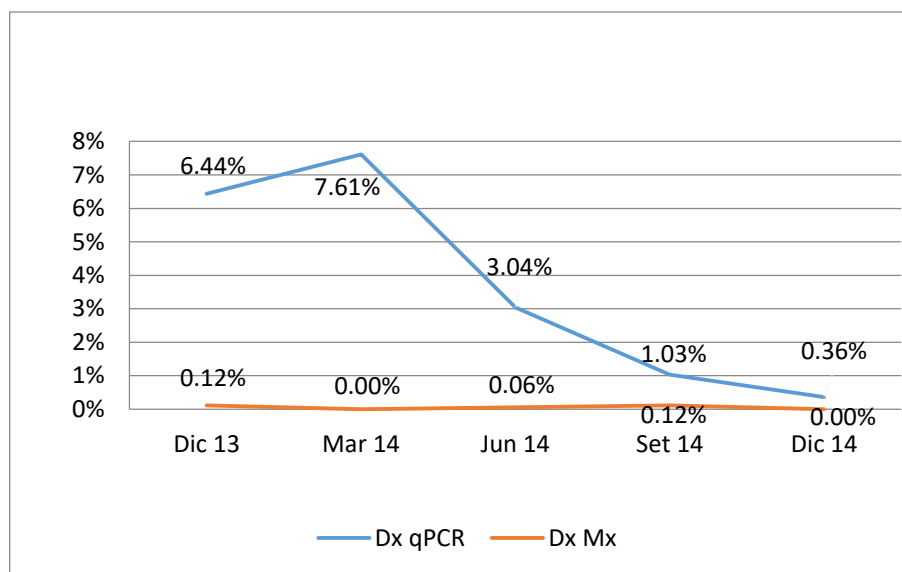


Figura 12: Prevalencia de *P. falciparum* mediante microscopía (Mx) y qPCR (Dx PCR) como métodos de diagnóstico (Dx) por mes de estudio.

La densidad de incidencia anual de casos de malaria durante el periodo de estudio fue de 0,15 infecciones por persona/año para *P. falciparum* y de 0,28 infecciones por persona/año para *P. vivax*. La comunidad de San José de Lupuna presentó una densidad de incidencia de 0,13 infecciones por persona/año para *P. vivax* y 0,06 infecciones por persona/año para *P. falciparum*; mientras que, en la comunidad de Cahuide, la densidad de incidencia para *P. vivax* fue de 0,25 infecciones por persona/año y de 0,08 infecciones por persona/año para *P. falciparum*.

9.2.2 Prevalencia y densidad de incidencia de estadio gametocito.

Del total de infecciones a malaria detectadas por qPCR (n=745), también se identificó la presencia de gametocitos por microscopía y RT-qPCR. Mediante RT-PCR se detectaron, 161 muestras positivas a gametocitos (143 para *P. vivax* y 18 para *P. falciparum*), mientras que la microscopía identificó solo 73 muestras (71

para *P. vivax* y 2 para *P. falciparum*). Del total de positivos a *P. vivax* (n=516), microscopía detectó 13,9% (71/516) de casos con gametocitos, mientras que por RT-qPCR se detectó en el 27,7% (143/516; Figura 13).

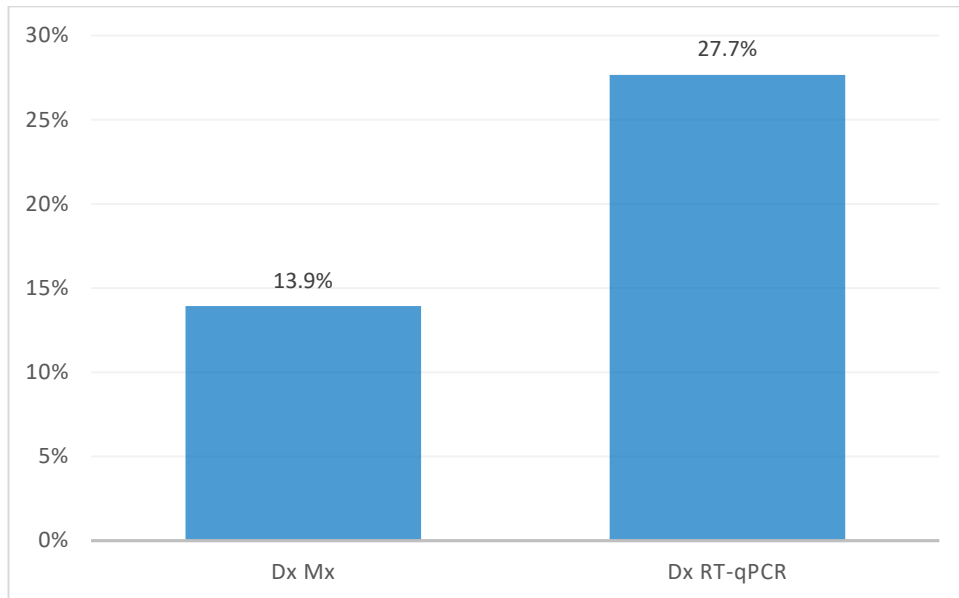


Figura 13: Porcentaje total de gametocitos en *P. vivax* detectadas mediante microscopía y RT-qPCR cuando el método de diagnóstico fue por PCR diagnóstico.

Cuando microscopia se utilizó como método de diagnóstico para malaria, solo detecto 161 casos (qPCR detectó 745 casos), de los cuales el 44,7% (72/161) presentaron gametocitos por microscopia, mientras que RT-qPCR detectó 57,1% (92/161) casos con gametocitos. (Figura 14).

En el caso de *P. falciparum* (n=229) microscopía solo detectó 2 casos, mientras que RT-qPCR detectó 18.

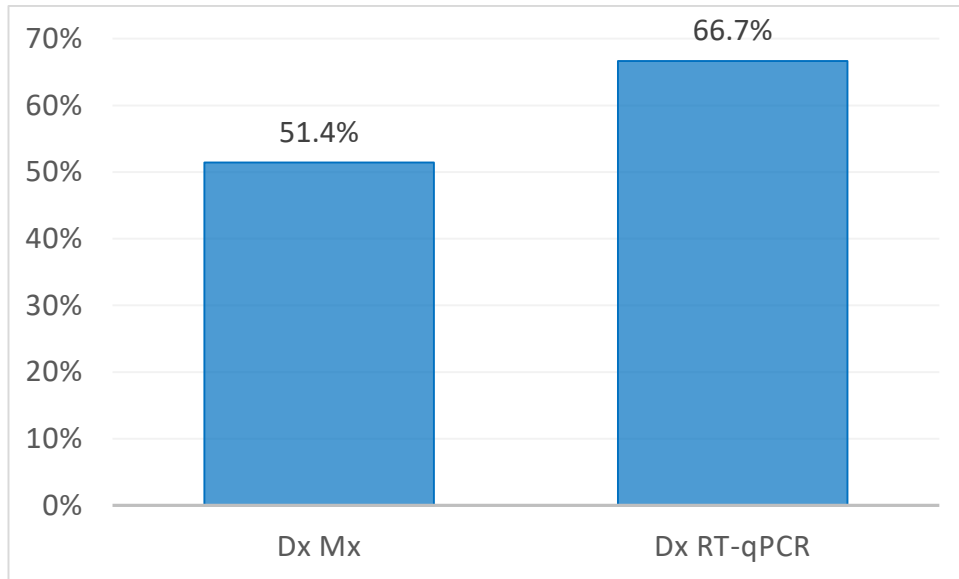


Figura 14: Porcentaje total de gametocitos en *P. vivax* detectadas mediante microscopía y RT-qPCR cuando el método de diagnóstico fue microscopía.

El porcentaje de gametocitos de *P. vivax* detectados en muestras positivas cambió en el tiempo, observándose una mayor presencia de gametocitos en el mes de Marzo para el RT-qPCR y en Junio para la microscopía (Figura 15).

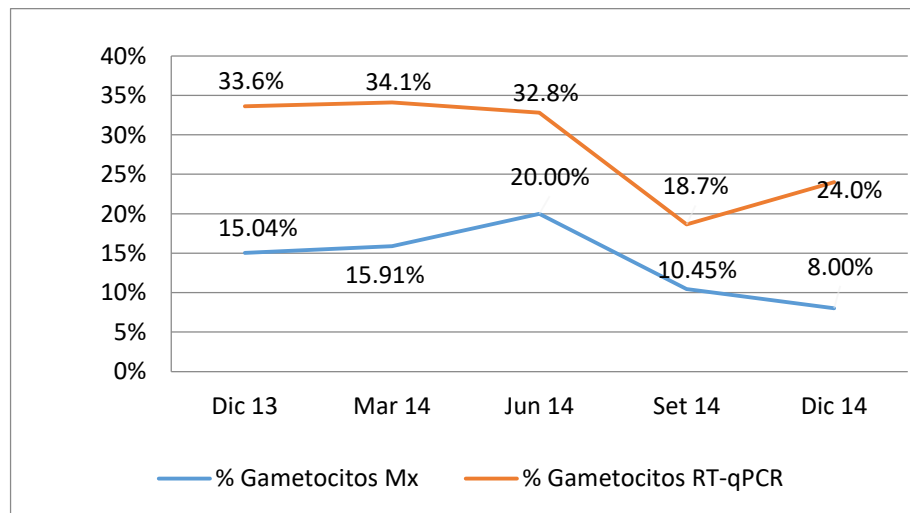


Figura 15: Comparación entre porcentaje de gametocitos en muestras *P. vivax* positivas mediante microscopía (% Gametocitos Mx) y RT-qPCR (% Gametocitos RT-qPCR) como métodos de detección por mes de estudio.

En el caso de *P. falciparum*, cada método de diagnóstico identifica el mayor porcentaje de gametocitos en un mes distinto. La prueba de RT-qPCR muestra que el mayor porcentaje de gametocitos se encuentra en el mes de Diciembre 2014, mientras que microscopía lo identifica en el mes de Diciembre 2013 y Setiembre 2014 (Figura 16). Los resultados mostrados en la figura 16, indican para Diciembre del 2014 una proporción de infecciones con gametocitos del 50% pero para este mes solo se reportaron 6 casos de *P. falciparum* (mes con menor prevalencia de *P. falciparum*, figura 12) de los cuales 3 tuvieron gametocitos, algo similar ocurre en el mes de Setiembre, aunque el porcentaje de gametocitos en estos dos meses son las más altas entre todas las evaluaciones, estos mismos meses fueron los que tuvieron menor prevalencia de casos de *P. falciparum* (figura 12).

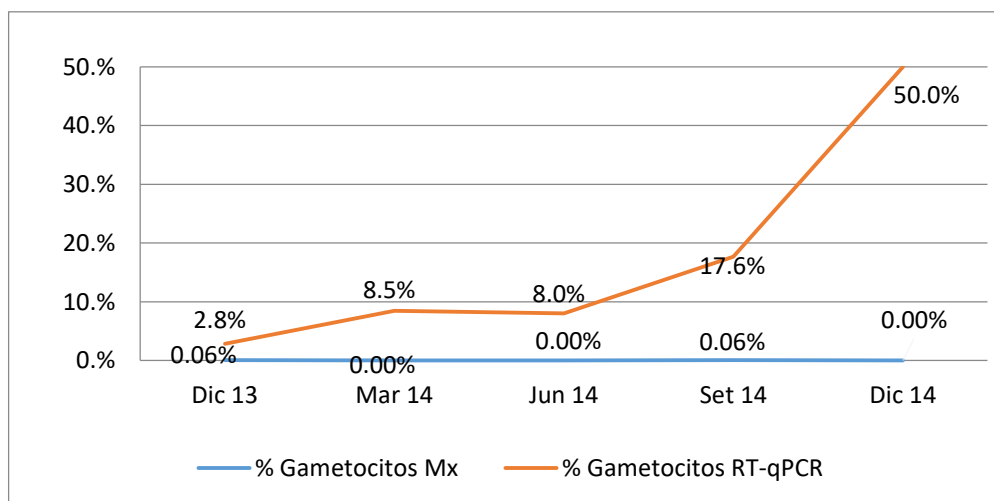


Figura 16: Comparación entre porcentaje de gametocitos en muestras *P. falciparum* positivas mediante microscopía (% Gametocitos Mx) y RT-qPCR (% Gametocitos RT-qPCR) como métodos de detección por mes de estudio.

La densidad de incidencia anual de gametocitos durante el periodo de estudio fue de 0,05 infecciones por persona/año para *P. falciparum* y 0,41 infecciones por

persona/año, de *P. vivax*, respectivamente. La comunidad de San José de Lupuna presentó una densidad de incidencia de 0,78 infecciones por persona/año para *P. vivax* y 0,01 infecciones por persona/año para *P. falciparum* en cambio en la comunidad de Cahuide, la densidad de incidencia para *P. vivax* fue de 0,36 infecciones por persona/año y para *P. falciparum* fue de 0,03 infecciones por persona/año.

Analizando independientemente cada zona de estudio, en San José de Lupuna se encontró un incremento en la proporción de gametocitos en *P. vivax* durante el 2014, llegando a un máximo de casos en el mes de Marzo con 61%, (8/13), el cual fue descendiendo en los meses siguientes. Por otro lado, en el caso de Cahuide, se da de forma distinta. La proporción de gametocitos fluctúa entre los puntos de colecta, teniendo los meses de Diciembre 2013 con 50,98% (26/51), en Junio con 24,24% (8/33) y Diciembre 2014 con 13,04% (3/23), mayor proporción que en los meses de Marzo con 2,58% (7/31) y Setiembre 2014 con 2,86% (2/70) (Figura 17). Además, se encontró que en San José de Lupuna la proporción de gametocitos total es del doble que la que se presentó en Cahuide (67,83% vs 32,17%).

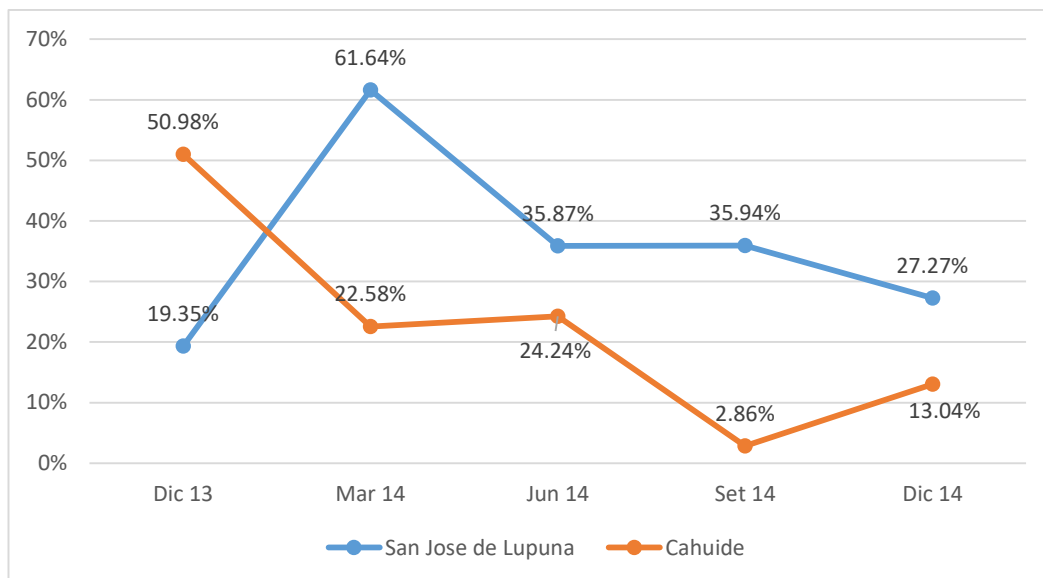


Figura 17: Cambios en el porcentaje de gametocitos en muestras de *P. vivax* positivas mediante qPCR en las dos zonas de estudio.

En el caso de *P. falciparum*, se encontró que la mayor proporción de gametocitos, tanto en San José de Lupuna como en Cahuide, ocurrió en el mes de Diciembre, 40% (2/5) y 100% (solo 1 caso fue positivo a *P. falciparum* y este tuvo gametocitos) respectivamente (Figura 18).

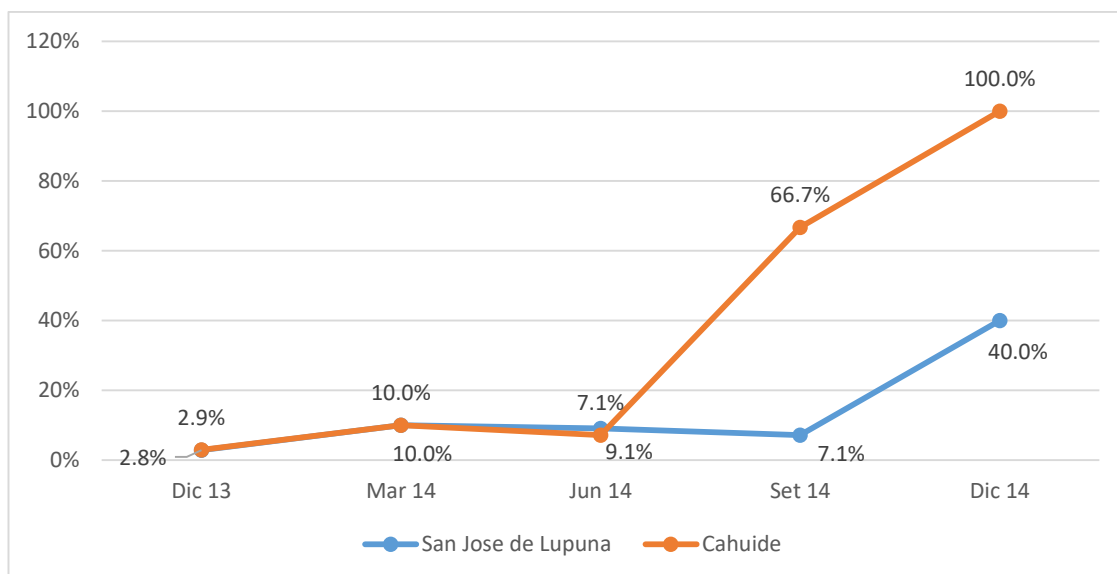


Figura 18: Cambios en el porcentaje de gametocitos en muestras de *P. falciparum* positivas mediante qPCR en las dos zonas de estudio.

Si comparamos las 2 áreas de estudio, se observa que el porcentaje de gametocitos en muestras positivas para *P. vivax*, en ambas zonas durante en el tiempo que duró el estudio es distinto (Figura 17), evidenciando que en San José de Lupuna existe un mayor porcentaje de casos con gametocitos que en Cahuide, además que no se ve una similitud en la dinámica. Para el caso de *P. falciparum*, como se muestra en el Figura 18, la tendencia es la misma para ambas comunidades, aunque en Cahuide se presenta un mayor porcentaje de casos con gametocitos al igual que para *P. vivax*.

Como análisis adicional, se comparó los resultados de prevalencia de gametocitos del presente estudio con lo reportado por *Barbosa et al.* (10) que detectó en más del 90% de casos de *P. vivax* la presencia de gametocitos por RT-qPCR. La diferencia del presente estudio con el de *Barbosa et al.* fue el volumen de colecta de muestra (50 µl de sangre del presente estudio vs. 200 µl de sangre del estudio de *Barbosa et al.*), Con el fin de obtener un factor que nos permita estimar el nivel de sensibilidad del RT-qPCR si tuviéramos un volumen de muestra como el utilizado en el estudio de *Barbosa et al.* se compararon ambos resultados.(Figura 19).

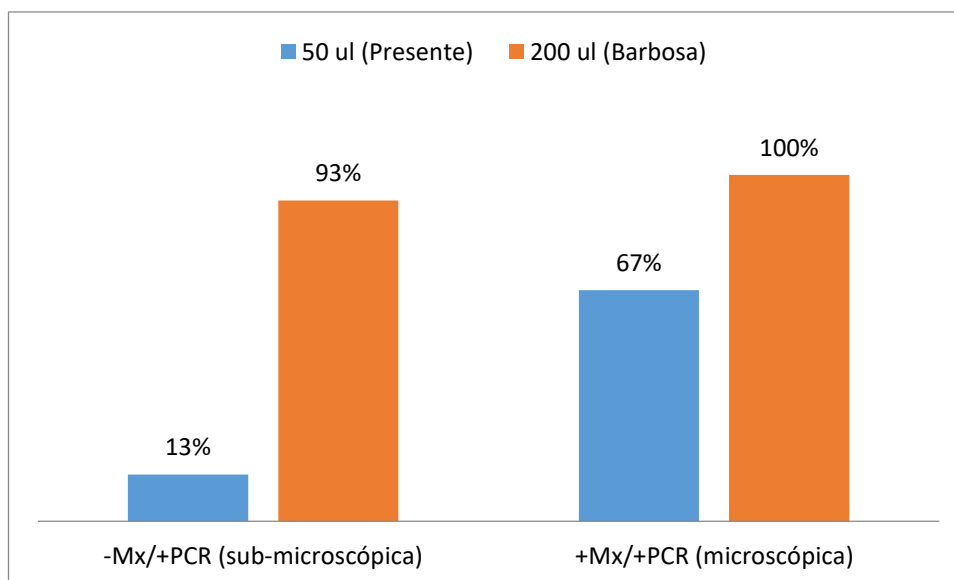


Figura 19: Comparación de resultados obtenidos durante el presente estudio y de Barbosa *et al.* (10) en la detección de gametocitos de *P. vivax*. El presente estudio colectó 50 µl de sangre, el estudio de Barbosa *et al.* colectó 200 µl.

Para el caso de infecciones sub-microscópicas de *P. vivax* se obtuvo un factor de 6.86 (93/13), para el caso de infecciones microscópicas se obtuvo un factor de 1.5 (100/67). Como el estudio de *Barbosa et al.* (10) solo se realizó en *P. vivax*, no se consideró este factor para utilizarlo con las infecciones de gametocitos de *P. falciparum*.

9.3 Identificación de factores asociados a la gametocitemia en poblaciones de baja transmisión de malaria en la Amazonia Peruana.

Para evaluar los factores asociados a la gametocitemia se consideraron solo las infecciones positivas por qPCR tanto para *P. vivax* como *P. falciparum*, teniendo una muestra final de 745 muestras (516 para *P. vivax* y 229 para *P. falciparum*).

El detalle de la población de estudio se muestra en la Tabla 1. De la población seleccionada, se observa que el mes de Diciembre del 2013 aportó más casos para

este análisis y que con la comunidad de Cahuide ocurrió lo mismo, siendo la mayoría del género masculino.

Tabla 1: Descripción de la población de estudio incluida para el análisis de factores asociados a gametocitemia

Variable	Cantidad
Muestras colectadas por mes	
Diciembre 2013	219
Marzo 2014	94
Junio 2014	175
Setiembre 2014	151
Diciembre 2014	106
Muestras colectadas por Comunidad	
Cahuide	350
Lupuna	395
Género	
Masculino	392
Femenino	353
Rango de Edad	
Menor a 6 años	41
De 6 a 9 años	91
De 10 a 19 años	198
De 20-39 años	201
Mayor a 39 años	214
Menores de 6 años	24
Gestantes	10
Episodio previo de malaria	241
Fiebre	29

Para estratificar los grupos de edades se consideró la actividad social del individuo dentro de la comunidad, así tenemos: menor en edad de colegio, edad

en etapa de estudios primarios, secundarios, trabajo. La mayoría de la población de estudio fueron los que pertenecían a los grupos mayores a 10 años. Algunos reportes han encontrado que los niños menores de 6 años tiene mayor presencia de gametocitos debido a las poca exposiciones que han tenido con el parásito por lo cual se consideró incluir esta categoría adicional (4).

Solo se encontraron 10 gestantes en todo el grupo de estudio. El 32% de la población reportó haber tenido malaria al menos una vez y solo 29 personas reportaron tener fiebre al momento de la colecta.

9.3.1 Análisis de Regresión de Poisson Multinivel Bivariado.

Para ambas especies, no se encontró asociación al comparar los distintos grupos de edades (<6, 6-9, 10-19,20-39 y 39 años a más) con la presencia de gametocitos por grupo de edad. Además, al analizar solo a las personas menores de 5 años contra los mayores, tampoco se observó asociación entre el grupo de menores de 5 años y presencia de gametocitos.

La zona geográfica muestra ser un factor asociado a *P. vivax* con la presencia de gametocitos dentro de la población, en otras palabras, las personas infectadas con *P. vivax* en San José de Lupuna tienen 1,45 veces la probabilidad de tener gametocitos que aquellos que viven en Cahuide, en el caso de *P. falciparum* la zona geográfica no mostró estar asociada a la presencia de gametocitos. En el caso del género de los individuos, este factor no está asociado con la presencia o producción de gametocitos,

Tabla 2: Resultados de los factores asociados a la presencia de gametocitos mediante un análisis de regresión de Poisson multinivel bivariado. En negrita se marca los valores significativos. *Se hizo el análisis solo en mujeres

Factor asociado	<i>Plasmodium falciparum</i>			<i>Plasmodium vivax</i>		
	PR	p value	IC 95%	PR	p value	IC 95%
Rango de Edad						
Menor a 6 años						
De 6 a 9 años	1,23	p=0,863	[0,11-13,62]	1,14	p=0,792	[0,42-3,07]
De 10 a 19 años	1,36	p=0,785	[0,14-13,16]	1,28	p=0,591	[0,51-3,23]
De 20-39 años	0,35	p=0,465	[0,22-5,69]	1,07	p=0,886	[0,42-3,71]
Mayor a 39 años	3,34	p=0,247	[0,43-25,93]	0,96	p=0,941	[0,37-2,46]
Menores de 6 años						
Mayor a 6 años	1,71	p=0,600	[0,22-12,89]	1,11	p=0,814	[0,45-2,71]
Zona Geográfica						
Cahuide						
San José de Lupuna	1,01	p<0,937	[0,40-2,67]	1.45	p=0.048	[1,01-2,02]
Género						
Masculino						
Femenino	0,97	p=0.956	[0,38-2,45]	1,12	p=0,469	[0,81-1,56]
Gestantes	2,11E+7	p=0,998		1,63	p=0,626	[0,22-11,92]
Mes de Colecta						
Diciembre 2013						
Marzo 2014	3,53	p=0.,084	[0,84-14,76]	1,01	p=0,964	[0,55-1,84]
Junio 2014	2,82	p=0,174	[0,63-12,62]	0,97	p=0,912	[0,62-1,51]
Setiembre 2014	6,23	p=0,025	[1,25-30,89]	0,55	p=0,022	[0,33-0,91]
Diciembre 2014	17,66	p<0,001	[3,56-87,53]	0,71	p=0,196	[0,42-1,18]
Episodio previo	2,18E-8	p=0,997		0,88	p=0,524	[0,61-1,27]
Preencia de fiebre	9,28	p=0,003	[2,13-40,41]	3,47	p<0,001	[2,20-5,47]

No se observó asociación a la presencia de gametocitos entres gestantes al compararlas con las mujeres no gestantes. El mes de colección de muestra mostró resultados significativos asociados a la gametocitemia, para el caso de *P.*

falciparum, los meses de Setiembre y Diciembre del 2014 indican una mayor probabilidad de presentar gametocitemia, a diferencia de *P. vivax*, que en el mes de Setiembre la probabilidad de gametocitemia disminuye (PR=0.55). Al analizar la presencia de fiebre, nos dio como resultado que la presencia de fiebre está relacionado a la presencia de gametocitos para ambas especies, el riesgo de presentar gametocitos de *P. falciparum* cuando se tiene fiebre es 9,28, veces más que en personas que no presentan fiebre, mientras que para *P. vivax* es de 3,47.

Adicionalmente se hizo un analisis de regresion multinivel de Poisson bivariado, pero considerando el criterio inclusion para el analisis de los factores asociados los individuos que fueron solo positivos por microscopia. El resultado mostró que solo la fiebre sigue siendo el unico valor significativo para el caso de *P. vivax* (Tabla 3)

Tabla 3: Resultados de factores asociados a la presencia de gametocitos mediante un análisis de regresión multinivel de Poisson bivariado considerando el criterio de inclusión microscopia positivo. En negrita se los valores significativos. *Se hizo el análisis solo en mujeres

Factor asociado	<i>Plasmodium falciparum</i>			<i>Plasmodium vivax</i>		
	PR	p value	IC 95%	PR	p value	IC 95%
Rango de Edad						
Menor a 6 años						
De 6 a 9 años	0,99	p=1	[0,56-1,76]	1,03	p=0,885	[0,64-1,65]
De 10 a 19 años	0,99	p=1	[0,60-1,65]	1,03	p=0,792	[0,68-1,63]
De 20-39 años	0,99	p=1	[0,60-1,64]	0,93	p=0,771	[0,61-1,45]
Mayor a 39 años	1,05	p=0,82	[0,65-1,71]	0,94	p=0,809	[0,61-1,46]
Menores de 5 años						
Mayor a 5 años	1,01	p=0,95	[0,56-1,82]	0,90	p=0,71	[0,54-1,51]
Zona Geográfica						
Cahuide						
San José de Lupuna	1,04	p<0,738	[0,80-1,38]	1,03	p=0,697	[0,87-1,21]
Género						
Masculino						
Femenino	0,96	p=0,791	[0,74-1,24]	1,00	p=0,908	[0,85-1,18]
Gestantes	1	p=1	[0,39-2,51]	0,95	p=0,907	[0,42-2,15]
Mes de Colecta						
Diciembre 2013						
Marzo 2014	0,98	p=0,913	[0,70-1,37]	1,00	p=0,964	[0,72-1,39]
Junio 2014	0,98	p=0,913	[0,70-1,37]	0,97	p=0,725	[0,82-1,31]
Setiembre 2014	1,09	p=0,71	[0,67-1,78]	0,55	p=0,735	[0,73-1,21]
Diciembre 2014	0,98	p=0,96	[0,43-2,23]	0,71	p=0,627	[0,72-1,21]
Episodio previo	0,98	p=0,951	[0,54-1,75]	0,96	p=0,680	[0,80-1,15]
Presencia de Fiebre	0,98	p=0,976	[0,31-3,06]	1,48	p=0,012	[1,09-2,03]

9.3.2 Análisis de Regresión de Poisson Multinivel Multivariado

Después del análisis multinivel, para *P. vivax* la variable lugar no fue significativa, por lo que se retiró de las variables asociadas. Para ambas especies las 2 variables asociadas a la gametocitemia para este estudio fueron: fiebre y mes de colecta. Como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4: Resultados de los factores asociados a la presencia de gametocitos mediante un análisis de regresión de Poisson multinivel multivariado. * No es significativo

Factor asociado	PR	P< value	IC 95%
<i>Plasmodium falciparum</i>			
Mes de Colecta			
Marzo 2014*	3,15	p=0.117	[0.74-13.29]
Setiembre 2014	7,15	p=0,016	[1,43-35,68]
Diciembre 2014	19,06	p<0,001	[3,82-95,16]
Presencia de fiebre	11,41	P=0,002	[2,48-52,53]
<i>Plasmodium vivax</i>			
Mes de Colecta			
Setiembre 2014	0,52	p=0,014	[0,31-0,87]
Zona Geográfica*			
San José de Lupuna	1,39	p<0,086	[0,95-2,02]
Presencia de fiebre	3,45	P<0,001	[2,17-5,48]

Finalmente se analizó la fiebre como factor asociado a la presencia de gametocitemia. Del total de individuos que se detectaron gametocitos más del 80% no presentó fiebre (Figura 20). Del total de individuos que presentaron fiebre (n=29), el 83% se detectó gametocitos mediante RT-qPCR.

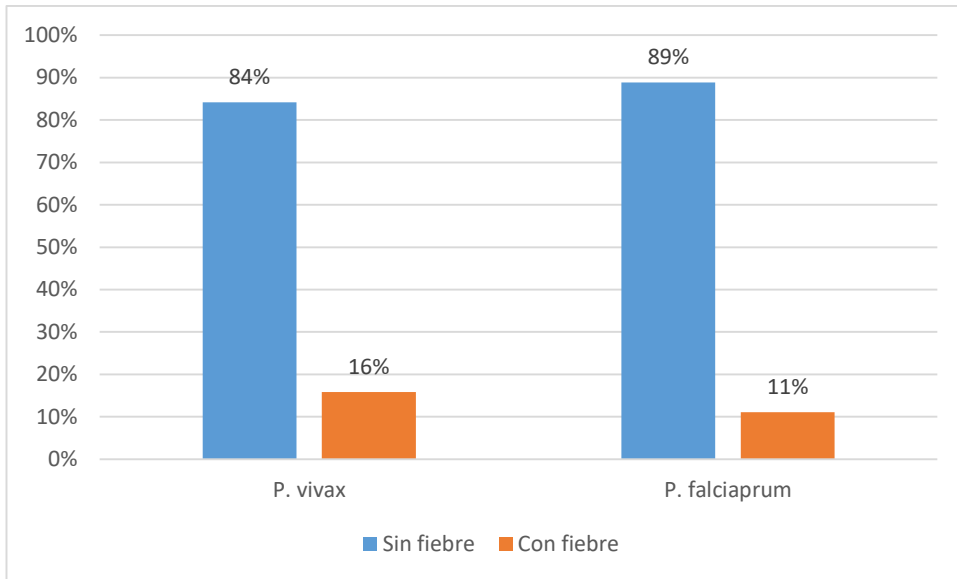


Figura 20: Comparación entre Individuos con gametocitos detectados por RT-qPCR a *P. falciparum* y *P. vivax* y la presencia de fiebre.

10. Discusión

El presente estudio encontró que para ambas especies el factor asociado a gametocitemia fue la presencia de fiebre. Además, en el caso de *P. falciparum*, la colecta durante el mes de Setiembre y Diciembre estuvo asociado a la gametocitemia, a diferencia de *P. vivax* que durante el mes de Setiembre la probabilidad de presentar infecciones con gametocitos disminuye a un 55%. (Tabla 2)

Del total de muestras analizadas para diagnóstico de malaria, microscopía dio un 2,23% de prevalencia, mientras que el diagnóstico por qPCR detectó un 10,29% de casos (4,6 veces más). Estos resultados están de acuerdo con lo reportado en estudios realizados en zonas de bajas transmisión, donde han encontrado que por métodos moleculares se ha podido identificar hasta 7 veces más infecciones de malaria que lo reportado por microscopía (3,6,8–10,16).

Según el Ministerio de Salud, en el 2014 el mes donde se reportaron la mayor cantidad de casos fue el mes de Junio para ambas especies (36). Diferiendo de nuestro estudio en que se determinó que Setiembre fue el mes con mayor número de casos para *P. vivax* y el mes de Marzo para *P. falciparum*. Cabe mencionar que el reporte del MINSA y el nuestro difieren en que los reportes del Ministerio de Salud son en base a la detección pasiva y usando como método de diagnóstico la microscopía, por el cual los casos sub-microscópicos no son reportados; mientras que en el presente estudio se empleó una detección activa y una prueba molecular

más sensible que incrementa hasta en 3 ó 4 veces más de casos de *P. vivax* como se observa en figura 11 y 12.

Como se mencionó en los resultados el uso del RT-qPCR permitió detectar 2 veces más casos de infecciones con gametocitos que lo reportado por microscopía, lo que evidencia el aumento en el número de infecciones con gametocitos al usar métodos moleculares de detección como el RT-qPCR. Estos resultados son similares a lo encontrado por Waltmann *et al.*, donde se encontró alrededor del 23 % del total de casos presentaban gametocitos, mientras que microscopía detectó menos de 5% (38).

Tanto el presente estudio como el de Waltmann *et al.* (38) utilizaron el protocolo reportado por Wampfler *et al.* (17) obteniendo un límite de detección (LOD de sus siglas en inglés) menor a 0.1 gametocitos/ μ l. Otros estudios han reportado diversos LOD dependiendo la metodología usada fluctuando entre 0.002 gametocitos/ μ l (47) hasta 119 gametocitos/ μ l (18). De los distintos estudios realizados en la detección de gametocitos utilizando herramientas moleculares (4,16–19,21,22,38,47), el protocolo de Wampfler *et al.* es uno de los que presenta un LOD más sensibles.

Otro factor que puede influenciar los resultados es el volumen de muestra colectada. Aunque el volumen colectado en nuestro estudio (50 μ l de sangre) fue similar al estudio de Waltmann *et al.* (38) y Wampfler *et al.*(17), el resultado es distinto al estudio realizado por Barbosa *et al.* (10) en Remansinho, Brasil, donde

se detectaron gametocitos en más del 90% de casos de *P. vivax*, utilizando RT-qPCR a partir de un análisis de 200 ul de muestra colectada.

Si consideramos el factor obtenido entre las comparaciones de los resultados obtenidos del presente estudio y el reportado por Barbosa *et al.* (10) para las infecciones microscópicas (1,5 veces) y sub-microscópicas (6,86 veces) (Figura 19), y considerando también que el volumen de muestra de sangre colectadas es 4 veces más en el estudio de Barbosa *et al.* podríamos esperar que, si este estudio hubiera colectado mayor volumen de muestra, hubiéramos detectado una mayor presencia de gametocitos e incluso llegar a obtener resultados similares a los obtenidos por Barbosa *et al.* (10) Otro estudio realizado por Buates *et al* colecta aun mayor cantidad de sangre (500 µl) que la del estudio de Barbosa *et al.* y menciona un LOD de 0.002 gametocitos/µl (47) Estas consideraciones en la toma de muestras y el factor obtenido del presente estudio en comparación con el de Barbosa *et al.* sugieren un subestimación en la detección de gametocitos lo que podría afectar la precisión los resultados obtenidos en los análisis de regresión de Poisson multinivel bivariado y multivariado podrían no ser los exactos.

Si consideramos solo las infecciones microscópicas como en el estudio de Barbosa *et al.*, el porcentaje de detección para el presente estudio aumenta hasta un 57.7% de casos detectados por RT-qPCR (Figura 14), lo que indicaría que los factores previamente mencionados podrían sustentar las diferencias entre los resultados reportados por Barbosa *et al.* y este estudio, o lo reportado por Buates *et al.* capaz de detectar 1 gametocito/500 ul de sangre.

Si se compara el volumen de muestra colectada y analizada con la cantidad que un mosquito puede absorber al momento de picar a una persona, este volumen puede variar entre 20 a 50 veces más que lo que absorbe un mosquito según Barbosa y Buates. En este estudio solo se evaluó un rango menor de análisis, 50 µl de muestra de punción dactilar y acercarnos al valor que puede absorber el mosquito entre 1 a 3 µl de sangre (3,32).

Si comparamos los resultados de detección de gametocitos obtenida por microscopia de las figuras 15 y 16 (línea azul), con la figura 11 y 12 en las que se muestran la prevalencia de cada especie, mostrándose observa una dinámica similar entre casos reportados y la presencia de gametocitos. Pero si comparamos los resultados de las pruebas moleculares, los resultados del RT-qPCR de las figuras 15 y 16 (línea roja) con los resultados de qPCR de las figuras 11 y 12 respectivamente, vemos que hay variaciones en las proporciones de los gametocitos que cambian de manera inversa, disminuye la cantidad de casos, pero aumento la proporción de casos con gametocitos.

De acuerdo a lo mencionado por Bousema y Drakeley (3), diversos estudio han evidenciado que en las épocas de seca (dry season) los casos empiezan a disminuir, pero la proporción de gametocitos aumenta, lo que permite mantener la transmisión en épocas de baja transmisión, algo similar a lo que ocurre en este estudio en *P. falciparum*. Este aumento en la proporción de gametocitos durante los meses de Setiembre y Diciembre favorece a las infecciones y se vuelve un factor asociado a las infecciones para *P. falciparum* como se muestran en nuestras

resultados (tabla 2 y 4). Un comportamiento contrario se observa en *P. vivax*, coincidente con lo reportado por Bousema y Drakeley (3) cuando hay un aumento de casos, la proporción de gametocitos disminuye, esto se observa durante el mes de Setiembre, donde disminuye la probabilidad de una persona infectada presente gametocitos (tabla 2 y 4), aunque esta asociación no está bien definida para estudios longitudinales y en zonas de baja endemicidad (3).

Las diferencias ente la dinámica de transmisión entre las 2 zonas geográficas del estudio podría deberse a que estas dos zonas distan entre ellas 60 km, y presentan como barrera natural a los ríos Itaya al sur (Cahuide) y Nanay al norte (San José de Lupuna) (Figura 2). En el 2012 se presentó una inundación en la zona de Cahuide, lo que aumentó el número de casos y llego a tener una mayor prevalencia que en San José de Lupuna; pero después de la inundación los casos fueron disminuyendo hasta que regreso a su condición normal de una zona de baja prevalencia y sin un patrón estacional marcado (datos del laboratorio de malaria, LID, UPOCH no publicados), por lo que la presencia de casos con gametocitos no presentaría una dinámica estacional como se muestras en la figura 17.

Por el contrario, San José de Lupuna es un área de alta prevalencia de malaria, que cumple la dinámica de transmisión estacional característica con la zona norte de la Amazonia Peruana (48), la cual coincide con lo reportado por la Dirección General de Epidemiología (36), y que se puede observar en la presencia de casos con gametocitos como se muestra en la figura 17.

Moreno *et al.* (31) reporta para el 2012, que tanto Cahuide como San José de Lupuna presentan microgeografías propias, donde el vector tiene patrones de picaduras distintos y a diferentes horas, siendo este un factor que podría también explicar estas diferencias encontradas en las zonas de estudio. Otro factor que podría explicar las diferencias encontradas, es la vía de acceso. San José de Lupuna tiene como única vía de ingreso el río Nanay, al ser una zona relativamente aislada con solo una cepa circulante (datos del laboratorio de malaria, LID, UPOCH no publicados), el ingreso de cepas distintas por factores externos (migración de zonas más alejadas, aumento del vector, actividades como agricultura y pesca, entre otros) podría generar brotes ocasionando los patrones estacionales que presenta esta zona (9,48), coincidiendo con nuestros resultados del patrón estacional que presentan los gametocitos en esta zona. Cahuide, que además del río Itaya, presenta la carretera Iquitos-Nauta, la que permite un mayor flujo de la población, lo que generaría un mayor ingreso de cepas distintas del parásito generando en la población una mayor exposición a diferentes cepas, por lo que tendrían una mayor tolerancia a los parásitos (bajas parasitemias) y por lo tanto una menor presencia de gametocitos, a diferencia que en San José de Lupuna.

Aunque existen claras evidencias que la dinámica de la gametocitemia es distinta en ambas zonas geográficas estudiadas, estas diferencias no son lo suficientemente significativas desde el punto de vista estadístico para considerar que un factor asociado a la presencia de infecciones con gametocitos sea la zona geográfica.

A diferencia de estudios realizados en zonas de alta transmisión, lo encontrado en este estudio difieren, los resultados muestran que la edad no es un factor que este asociado a la presencia de gametocitemia (Tabla 2 y 3), incluso agrupando en 2 rangos, menores y mayores de 5 años no muestra una asociación, esto indicaría que la presencia de gametocitos no estaría regulada por constantes exposiciones como ocurre en otras zonas de baja transmisión como Brasil (10) o las Islas Solomon (38), sino que existirían otros factores distintos a la edad, que regularían la gametocitemia como la lenta transmisión reportada por Rosas *et al.* (49,50) en la Amazonia Peruana.

Factores como el género se ha visto que no tiene asociación con la presencia de gametocitos (3,11,38), resultados similares se han encontrado en este estudio. La zona geográfica no muestra ser un factor relacionado a la presencia de gametocitos, aunque las infecciones en San José de Lupuna muestran una mayor prevalencia (Figura 15), el análisis estadístico de asociación a presencia de gametocitos no muestra significancia estadística para considerar que la zona geográfica sea un factor determinante para tener infecciones con gametocitos.

Existen reportes que han encontrado cierta asociación entre la presencia de gametocitos en mujeres gestantes (3); pero en este estudio no se encontró esta asociación y podría ser debido al bajo número de gestantes incluidas en este estudio (n=10), por lo que esta resultado podría cambiar con un número mayor de gestantes.

Como se mencionó anteriormente este estudio encontró la fiebre como factor asociado a la presencia de gametocitos (3,51). Un estudio realizado por McKenzie *et al.* (12) con muestras de Perú y Tailandia, utilizando microscopía como método de detección, encontró que la gametocitemia estaba asociada a la fiebre en *P. vivax*.

A diferencia del estudio realizado por McKenzie que utilizó microscopía como método de detección de gametocitos, en el presente estudio se utilizó RT-qPCR, y aunque se encontraron casos que no fueron detectados por microscopía, los hallazgos fueron similares, la asociación de la fiebre a la presencia de gametocitos tanto para *P. vivax* como *P. falciparum*

La presencia de gametocitos está asociada a fiebres bajas o el grupo clasificado con poca frecuencia de fiebre en las infecciones con *P. falciparum*, dado que la fiebre puede eliminar gametocitos maduros o retrasar la maduración de estos (52); pero para el caso de *P. vivax* ocurre lo contrario. Distintos estudios encuentran resultados similares al nuestro, una asociación entre gametocitemia y la presencia de fiebre, aunque no se ha profundizado en la razón para esta asociación, un factor podría ser la rápida maduración (3 días) de los gametocitos en *P. vivax* (3). La maduración rápida de los gametocitos podría evadir el efecto de la fiebre como factor para el retraso en la maduración o eliminación de los gametocitos como ocurre en *P. falciparum*.

Otro factor podría ser que la fiebre sea un estimulador en la producción de gametocitos en *P. vivax*. Aunque para ambos supuestos no hay evidencia que pueda precisar cuál es el más preciso, es evidente la mayor cantidad de casos de malaria que presentan gametocitos *P. vivax* sobre *P. falciparum* (22 para *P. vivax* vs 2 de *P. falciparum*) en presencia de fiebre, mostrando claramente la asociación entre la fiebre y la gametocitemia como se muestra en distintos estudios (12,53) incluyendo el presente.

Aunque los hallazgos encontrados en este estudio están basados en un protocolo previamente reportado que tiene alta sensibilidad en la detección de gametocitos, y además que ha sido utilizado para distintos tipos de estudios obteniendo un similar LOD (4,10,38,54), puede que hayan infecciones por debajo de este LOD que no han podido ser detectadas en este estudio. Cambios en el tipo de colecta o desarrollo de métodos más sensibles podrían aumentar la sensibilidad y el LOD para la detección de gametocitos, permitiendo corroborar los hallazgos de este estudio, o darnos una perspectiva distinta en relación a la gametocitemia en zonas de baja transmisión como lo es la Amazonia Peruana.

11. Conclusiones

- La fiebre es un factor que está asociado a la gametocitemia en infecciones asociadas a ambas especies de *Plasmodium*.
- En meses que disminuyen los casos de malaria por *P. falciparum* existe un aumento en la proporción de infecciones con gametocitemia, la cual podría ser una forma de mantener la transmisión.
- La presencia de infecciones de gametocitos detectadas solo por RT-qPCR en infecciones sub-microscópicas de malaria, indicarían que este tipo de infecciones serían posibles reservorios de la enfermedad y mantendrían la transmisión.
- Existen diferencias temporales en la dinámica de los gametocitos entre las dos zonas geográficas incluidas en este estudio.

12. Limitaciones

- La carencia de cultivos *in vitro* de *Plasmodium vivax*, no permite producir una curva estándar para esta especie, por lo que no se pudo determinar el LOD con cepas referenciales, y se debió utilizar una muestra de paciente.
- Los resultados obtenidos están basados en el LOD de la prueba de detección, por lo que las muestras que hayan dado como negativo a gametocitos, no pueden considerarse necesariamente como ausencia del gametocito, sino que pudieron estar por debajo del LOD de la prueba.
- Para lograr captar de manera más precisa la presencia de gametocitos, sería necesario hacer un seguimiento y colecta de muestras del paciente de manera diaria.

13. Recomendaciones

Considerar medir valores de hemoglobina y hematocrito a los individuos que participen en estudios similares, debido que han sido reportados como factores asociados a la gametocitemia.

14. Bibliografía

1. WHO. Who Report 2015. 2015;
2. Nilsson SK, Childs LM, Buckee C, Marti M. Targeting Human Transmission Biology for Malaria Elimination. *PLoS Pathog.* 2015;11(6):e1004871.
3. Bousema T, Drakeley C. Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(2):377–410.
4. Koepfli C, Robinson L, Rarau P, Salib M, Naomi S, Wampfler R, et al. Blood-stage parasitemia and age determine *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* gametocytemia in Papua New Guinea. *J Infect Dis.* 2014;Submitted.
5. 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;4:27.
6. 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;69(1):45–52.
7. 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;121(3):281–291.
8. Lin JT, Saunders DL, Meshnick SR. The role of submicroscopic parasitemia in malaria transmission: What is the evidence? *Trends Parasitol.* 2014;30(4):183–190.
9. 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;6(1).
10. 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;8(8).
11. Karl S, Laman M, Moore BR, Benjamin JM, Salib M, Lorry L, et al. Risk factors for *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocyte carriage in Papua New Guinean children with uncomplicated malaria. *Acta Trop.* 2016;160:1–8.

12. McKenzie FE, Wongsrichanalai C, Magill AJ, Forney JR, Permpanich B, Lucas C, et al. Gametocytemia in *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections. *J Parasitol.* 2006;92(6):1281–5.
13. Josling G a, Llinás M. Sexual development in *Plasmodium* parasites: knowing when it's time to commit. *Nat Rev Microbiol.* 2015;13(9):573–87.
14. Guttery DS, Roques M, Holder AA, Tewari R. Commit and Transmit: Molecular Players in *Plasmodium* Sexual Development and Zygote Differentiation. *Trends Parasitol.* 2015;31(12):676–685.
15. Grange L, Loucoubar C, Telle O, Tall A, Faye J, Sokhna C, et al. Risk factors for *Plasmodium falciparum* gametocyte positivity in a longitudinal cohort. *PLoS ONE.* 2015;10(4).
16. Lima NF, Bastos MS, Ferreira MU. *Plasmodium vivax*: Reverse transcriptase real-time PCR for gametocyte detection and quantitation in clinical samples. *Exp Parasitol.* 2012;132(3):348–354.
17. Wampfler R, Mwingira F, Javati S, Robinson L, Betuela I, Siba P, et al. Strategies for Detection of *Plasmodium* species Gametocytes. *PLoS ONE.* 2013;8(9):6–9.
18. Lawaly YR, Kuntabhai A, Marrama L, Konate L, Phimpraphi W, Sokhna C, et al. Heritability of the human infectious reservoir of malaria parasites. *PLoS ONE.* 2010;5(6).
19. Kuamsab N, Putaporntip C, Pattanawong U, Jongwutiwes S. Simultaneous detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* gametocytes in clinical isolates by multiplex-nested RT-PCR. *Malar J.* 2012;11:190.
20. Young JA, Fivelman QL, Blair PL, De La Vega P, Le Roch KG, Zhou Y, et al. The *Plasmodium falciparum* sexual development transcriptome: A microarray analysis using ontology-based pattern identification. *Mol Biochem Parasitol.* 2005;143(1):67–79.
21. Bharti AR, Chuquiyaauri R, Brouwer KC, Stancil J, Lin J, Llanos-Cuentas A, et al. Experimental infection of the neotropical malaria vector *Anopheles darlingi* by human patient-derived *Plasmodium vivax* in the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75(4):610–616.
22. Mlambo G. b, Vasquez Y. b, LeBlanc R. b, Sullivan D. b, Kumar N. b. Short report: A filter paper method for the detection of *Plasmodium falciparum* gametocytes by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;78(1):114–116.
23. Osler W. An Address on the Haematozoa of Malaria. *Br Med J.* 1887;1(1367):556–62.

24. Cox FE. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasit Vectors*. 2010;3(1):5.
25. Baker DA. Malaria gametocytogenesis. *Mol Biochem Parasitol*. 2010;172(2):57–65.
26. Ngwa CJ, Scheuermayer M, Mair GR, Kern S, Brügl T, Wirth CC, et al. Changes in the transcriptome of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* during the initial phase of transmission from the human to the mosquito. *BMC Genomics*. 2013;14:256.
27. Balaji S, Madan Babu M, Iyer LM, Aravind L. Discovery of the principal specific transcription factors of Apicomplexa and their implication for the evolution of the AP2-integrase DNA binding domains. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(13):3994–4006.
28. Kafsack BFC, Rovira-Graells N, Clark TG, Bancells C, Crowley VM, Campino SG, et al. A transcriptional switch underlies commitment to sexual development in malaria parasites. *Nature*. 2014;507(7491):248–52.
29. Guttery DS, Holder AA, Tewari R. Sexual development in plasmodium: Lessons from functional analyses. *PLoS Pathog*. 2012;8(1):8–10.
30. Sinha A, Hughes KR, Modrzynska KK, Otto TD, Pfander C, Dickens NJ, et al. A cascade of DNA-binding proteins for sexual commitment and development in *Plasmodium*. *Nature*. 2014;507(7491):253–7.
31. Moreno M, Saavedra MP, Bickersmith SA, Lainhart W, Tong C, Alava F, et al. Implications for changes in *Anopheles darlingi* biting behaviour in three communities in the peri-Iquitos region of Amazonian Peru. *Malar J*. 2015;14:290.
32. Jason Pitts R. A blood-free protein meal supporting oogenesis in the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus* (Skuse). *J Insect Physiol*. 2014;64(1):1–6.
33. Niederwieser I, Felger I, Beck HP. *Plasmodium falciparum*: expression of gametocyte-specific genes in monolayer cultures and malaria-positive blood samples. *Exp Parasitol*. 2000;95(3):163–9.
34. Babiker H a, Abdel-Wahab a, Ahmed S, Suleiman S, Ranford-Cartwright L, Carter R, et al. Detection of low level *Plasmodium falciparum* gametocytes using reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol*. 1999;99(1):143–148.
35. Beurskens M, Mens P, Schallig H, Syafruddin D, Asih PBS, Hermsen R, et al. Quantitative determination of *Plasmodium vivax* gametocytes by real-time quantitative nucleic acid sequence-based amplification in clinical samples. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;81(2):366–369.
36. Salud MD. Sala de Situación de Salud. 2014;2014.

37. Grande T, Bernasconi A, Erhart A, Gamboa D, Casapia M, Delgado C, et al. A randomised controlled trial to assess the efficacy of dihydroartemisinin-piperazine for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in Peru. *PLoS ONE*. 2007;2(10):1–7.
38. Waltmann A, Darcy AW, Harris I, Koepfli C, Lodo J, Vahi V, et al. High Rates of Asymptomatic, Sub-microscopic *Plasmodium vivax* Infection and Disappearing *Plasmodium falciparum* Malaria in an Area of Low Transmission in Solomon Islands. 2015;1–18.
39. Mawili-Mboumba DP, Nikiéma R, Bouyou-Akotet MK, Bahamontes-Rosa N, Traoré A, Kombila M. Sub-microscopic gametocyte carriage in febrile children living in different areas of Gabon. *Malar J*. 2013;12:375.
40. Makanga M. A review of the effects of artemether-lumefantrine on gametocyte carriage and disease transmission. *Malar J*. 2014;13(1):291.
41. Gutierrez S, Arospide N. *MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO DE MALARIA*. Minist Salud. 2003;
42. Fivelman QL, McRobert L, Sharp S, Taylor CJ, Saeed M, Swales CA, et al. Improved synchronous production of *Plasmodium falciparum* gametocytes in vitro. *Mol Biochem Parasitol*. 2007;154(1):119–23.
43. Ribaut C, Berry A, Chevalley S, Reybier K, Morlais I, Parzy D, et al. Concentration and purification by magnetic separation of the erythrocytic stages of all human *Plasmodium* species. *Malar J*. 2008;7:45.
44. Ramakers C, Ruijter JM, Lekanne Deprez RH, Moorman AFM. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett*. 2003;339(1):62–66.
45. Merlo J, Chaix B, Yang M, Lynch J, Rastam L. A brief conceptual tutorial of multilevel analysis in social epidemiology: linking the statistical concept of clustering to the idea of contextual phenomenon. *J Epidemiol Community Health*. 2005;59(6):443–9.
46. Merlo J, Chaix B, Ohlsson H, Beckman A, Johnell K, Hjerpe P, et al. A brief conceptual tutorial of multilevel analysis in social epidemiology: using measures of clustering in multilevel logistic regression to investigate contextual phenomena. *J Epidemiol Community Health*. 2006;60(4):290–7.
47. Buates S, Bantuchai S, Sattabongkot J, Han ET, Tsuboi T, Udomsangpetch R, et al. Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for clinical detection of *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Parasitol Int*. 2010;59(3):414–420.

48. 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;95(Suppl 6):133–44.
49. Rosas-Aguirre A, Speybroeck N, Llanos-Cuentas A, Rosanas-Urgell A, Carrasco-Escobar G, Rodriguez H, et al. Hotspots of malaria transmission in the Peruvian amazon: Rapid assessment through a parasitological and serological survey. *PLoS ONE.* 2015;10(9):1–21.
50. 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;14(1):2–11.
51. Stepniewska K, Price RN, Sutherland CJ, Drakeley CJ, von Seidlein L, Nosten F, et al. *Plasmodium falciparum* gametocyte dynamics in areas of different malaria endemicity. *Malar J.* 2008;7:249.
52. Aguilar R, Magallon-Tejada A, Achtman AH, Moraleda C, Joice R, Cisteró P, et al. Molecular evidence for the localization of *plasmodium falciparum* immature gametocytes in bone marrow. *Blood.* 2014;123(7):959–66.
53. McKenzie E. Gametocytemia and Fever in Human Malaria Infections. *J Parasitol.* 2007;148(4):825–32.
54. Mwingira F, Genton B, Kabanywanyi A-NM, Felger I. Comparison of detection methods to estimate asexual *Plasmodium falciparum* parasite prevalence and gametocyte carriage in a community survey in Tanzania. *Malar J.* 2014;13:433.