



**UNIVERSIDAD  
DE ANTIOQUIA**

**Persistencia de las infecciones submicroscópicas afebriles por  
Plasmodium spp. y sus factores asociados en una zona endémica  
para malaria en Colombia**

**Jehidys Estella Montiel Ramos**

**Universidad de Antioquia  
Facultad Nacional de Salud Pública  
Medellín, Colombia  
2020**



**Persistencia de las infecciones submicroscópicas afebriles por  
*Plasmodium* spp. y sus factores asociados en una zona endémica  
para malaria en Colombia**

**Jehidys Estella Montiel Ramos**

**Tesis para optar al título de  
Doctor en Epidemiología**

**Asesor**

**Alberto Tobón Castaño, PhD**

**Co-asesor**

**Daniel Camilo Aguirre, PhD**

**Comité de tesis doctoral**

**Lina Marcela Zuluaga Idárraga, PhD**

**Ana María Vásquez Cardona, PhD**

**Grupo de Investigación:  
Malaria**

**Universidad de Antioquia  
Facultad Nacional de Salud Pública  
"Héctor Abad Gómez"  
Medellín, Colombia  
2020**

*A mí siempre amiga Andrea Corrales  
quien ahora me mira desde el cielo*

## **Agradecimientos**

Esta tesis es el producto de un esfuerzo colaborativo de muchas personas que de una u otra manera se involucraron en esta aventura llamada doctorado, pero antes de hacer mención a cada una de ellas quiero infinitamente agradecer a Dios por estar conmigo en cada paso de este proceso, de Él recibí una promesa que se está haciendo realidad con la culminación de este manuscrito. Sabía que este camino no sería fácil, sabía que tendría que enfrentar muchos obstáculos y frustraciones, sabía que lograr esta meta implicaría sacrificar tiempo con mi esposo, familia y amigos, pero también sabía que valdría la pena. De este doctorado aprendí que hay que intentarlo las veces que sea necesario, aprendí a tener más confianza en mí misma, aprendí que cada persona tiene algo para enseñarme, aprendí que cada situación por adversa que parezca es una oportunidad para ser mejor, pero sobre todo, aprendí que cuando uno se llena de valor y da el primer paso para que las cosas sucedan, Dios te toma de la mano y sigue caminando contigo y nunca, nunca te suelta...

De manera muy especial quiero agradecer a los profesores de mi comité de tesis; Alberto Tobón Castaño, Daniel Camilo Aguirre, Lina Marcela Zuluaga y Ana María Vásquez, por su acompañamiento en mi proceso de formación; gracias por su paciencia, enseñanzas y compromiso.

Al Grupo Malaria de la Universidad de Antioquia, por ser un espacio de crecimiento académico y personal.

Al Instituto de Salud de Nariño, especialmente a la Dra. Pilar Pérez por su apoyo durante el trabajo de campo y por abrirnos un espacio de trabajo en la Unidad de Control de Vectores en Tumaco.

A FIND (Foundation for Innovative New Diagnostics) por la donación de las pruebas LAMP

A los participantes del estudio, por la confianza que depositaron en nosotros al aceptar participar.

A las auxiliares de campo Zully Toloza y Flor Portocarrero, por su compromiso, por estar siempre dispuestas a aprender y porque a pesar de todas las dificultades que afrontamos, siempre tuvieron la mejor actitud para sacar adelante este proyecto.



A las bacteriólogas Yuri Pino y Leydi Carolina González por la ejecución de las pruebas LAMP y por ser un apoyo en todo momento para las auxiliares de campo

A Luisa Carbal, quien sintió como suyo este proyecto, gracias por ser mi mano derecha y un apoyo incondicional en todo momento.

A la profesora Berlin Londoño de Kansas State University por abrirme las puertas de su laboratorio en 2018 para hacer mi pasantía y por darme la oportunidad de regresar nuevamente en 2019 ya como parte de su equipo de investigación, gracias por tan maravillosa oportunidad.

Al Dr. Kumar V. Udhayakumar y a la Dra. Naomi Lucchi por darme la oportunidad de hacer una pasantía en el CDC (Centers for Disease Control and Prevention), por su apoyo en las pruebas de laboratorio y por mostrarme el abanico de posibilidades con las que se puede afrontar un problema de investigación.

Al International Infectious Diseases & Global Health Training Program por regalarme la oportunidad de intercambiar experiencias, no solo académicas, sino de vida también.

A los profesores del programa de doctorado en epidemiología, por sus enseñanzas y a la coordinación del programa, especialmente a la profesora Paula Díaz por apoyo en todo momento.

A mis "Panderitos", Maritza, Erika L., Andrés, Jennifer, Luisa, Nico y Camilo, y a Julian y Erika F. por su amistad y apoyo en todo momento

A mi esposo William Pérez, quien siempre me impulsa a dar rienda suelta a mis sueños y a cada día a ser mejor, gracias por tu amor y tu paciencia.

A mis padres; Alfredo y Everlides, mis hermanas; Dennys y Noyra, mis hermosos sobrinos; Dany, Alejo y Teo y mis hermanos de vida, Caliche y Jorge, por ser mi motivación y mi luz

## **Fuentes de financiamiento**

### **COLCIENCIAS**

Convocatoria 744 para proyectos de ciencia, tecnología e innovación en salud-2016. Proyecto "Dinámica de las infecciones sub-microscópicas por *Plasmodium* spp. en una zona endémica para malaria en Colombia"  
Programa de becas de doctorados nacionales de Colciencias- 647 de 2014

### **CODI**

Convocatoria programática área CIENCIAS DE SALUD- 2016. Proyecto "Estudio epidemiológico e inmunológico de las infecciones asintomáticas por *Plasmodium* spp. en dos zonas endémicas para malaria en Antioquia (Colombia).

## **Entidades participantes**

Grupo Malaria de la Universidad de Antioquia, Medellín

Unidad de control de vectores-Instituto Departamental de Salud de Nariño, Tumaco Nariño

## Tabla de contenido

<b>Capítulo 1</b> .....	<b>21</b>
<b>1.</b> .....	<b>Introducción</b>
.....	<b>21</b>
1.1. Planteamiento del problema .....	21
1.2. Preguntas de investigación .....	25
1.3. Hipótesis .....	25
1.4. Justificación .....	26
1.5. Objetivos .....	28
1.6. Referencias .....	28
<b>Capítulo 2</b> .....	<b>34</b>
<b>2.</b> .....	<b>Antecedentes</b>
.....	<b>34</b>
2.1. Malaria: generalidades y contexto mundial .....	34
2.2. Malaria en Colombia .....	35
2.3. Ciclo biológico del <i>Plasmodium</i> spp. ....	37
2.4. Clínica de la malaria y respuesta inmune .....	38
2.5. Identificación de las infecciones por <i>Plasmodium</i> spp. ....	43
2.6. Clasificación de las infecciones por <i>Plasmodium</i> spp. ....	44
2.7. Contexto mundial y nacional de las infecciones submicroscópicas	
46	
2.8. Factores condicionantes de la infección por <i>Plasmodium</i> spp.	50
2.9. Persistencia de las infecciones por <i>Plasmodium</i> spp. ....	52
2.10. Impacto de las infecciones submicroscópicas en la transmisión	
56	
2.11. Consecuencia para la salud humana .....	58
2.12. Referencias .....	60
<b>Capítulo 3</b> .....	<b>72</b>
<b>3. Infecciones microscópicas y submicroscópicas por <i>Plasmodium</i> spp. en la costa Pacífica Colombiana: estudio epidemiológico e inmunológico</b> .....	<b>72</b>
3.1. Introducción .....	72
3.2. Métodos .....	75
3.3. Resultados .....	82
3.4. Discusión .....	93

3.5. Conclusión.....	98
3.6. Referencias .....	98
<b>Capítulo 4. ....</b>	<b>105</b>
<b>4.Persistencia de las infecciones submicroscópicas en el tiempo en una zona endémica para malaria en Colombia .....</b>	<b>105</b>
4.1. Introducción .....	105
4.2. Métodos .....	108
4.4. Discusión .....	120
4.5. Conclusiones.....	125
4.6. Referencias .....	125
<b>Capítulo 5. ....</b>	<b>131</b>
<b>5.CONSIDERACIONES</b>	<b>FINALES</b>
.....	<b>131</b>
5.1. Conclusiones generales .....	131
5.2. Sesgos y limitaciones.....	133
5.3. Contextualización de los resultados .....	136
5.4. Importancia de los resultados a la luz de los programas de eliminación.....	138
5.5. Referencias .....	143
<b>Información suplementaria .....</b>	<b>146</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>178</b>

## Lista de tablas

### Capítulo 2

**Tabla C2.1** Proporción de infecciones por *Plasmodium* spp. que son submicroscópicas según nivel de transmisión (56) .....47

**Tabla C2.2.** Resumen de los principales estudios sobre persistencia de las infecciones por *Plasmodium* spp. ....55

### Capítulo 3

**Tabla C3.1.** Prevalencia total y por prueba diagnóstica de las infecciones por *Plasmodium* spp. en la población de estudio .....84

**Tabla C3.2.** Características clínicas, sociodemográficas y de antecedentes de malaria en la población de estudio según infección por *Plasmodium* spp. ....85

**Tabla C3.3.** Características del individuo y la vivienda y su asociación con las infecciones por *Plasmodium* spp. ....87

### Capítulo 4

**Tabla C4.1** Persistencia de infecciones submicroscópicas en el municipio de Tumaco, Nariño ..... 113

**Tabla C4.2** Asociación entre los antecedentes de malaria y los niveles de anticuerpos con la negativización de la infección..... 119

## Lista de figuras

### Capítulo 2

<b>Figura C2.1.</b> Tasa de incidencia de malaria en Colombia, Nariño y Tumaco desde el 2009 a 2018 (10, 11).....	36
<b>Figura C2.2.</b> Casos notificados de malaria en los municipios endémicos del departamento de Nariño, 2017-2018 (10). .....	37
<b>Figura C2.3</b> Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> spp. (13). .....	38
<b>Figura C2.4.</b> Prevalencia de las infecciones submicroscópicas en Colombia. ....	49
<b>Figura C2.5.</b> Trayectorias hipotéticas de las infecciones submicroscópicas .....	53

### Capítulo 3

<b>Figura C3.1.</b> Localización de los sitios de estudio en el Municipio de Tumaco, Nariño, Colombia. ....	76
<b>Figura C3.2</b> Niveles de IgG contra Pf-MSP1 (A), Pf-AMA1 (B), Pv-MSP1 (C) y Pv-121 (D) por grupo de infección. ....	91
<b>Figura C3.3</b> Niveles de IgM contra Pf-MSP1 por grupo de infección. ...	92
<b>Figura C3.4</b> Portadores de gametocitos en infecciones submicroscópicas .....	93

### Capítulo 4

<b>Figura C4.1</b> Diagrama de flujo de los participantes con infección submicroscópica .....	112
<b>Figura C4.2.</b> Curva de Kaplan-Meier para la estimación de la persistencia de las infecciones submicroscópicas en el tiempo empleando la prueba LAMP .....	114
<b>Figura C4.3</b> Curva de Kaplan-Meier para la estimación de la persistencia de las infecciones submicroscópicas en el tiempo empleando la prueba LAMP según antecedentes de malaria en toda la vida (A) y en el último años (B), según la edad (C), IgG anti Pf-MSP1 (D), IgG anti Pf-AMA1 (E), IgG anti Pv-MSP1 (F), anti Pv-121 (G) y IgM anti Pf-MSP1 (H). .....	116



## Capítulo 5

**Figura C5.1.** Proporción de casos de malaria con respecto al total de casos en Tumaco reportados en el sistema de vigilancia (Barras solidas) y proporción de infecciones submicroscópicas detectadas en el estudio (Barras con patrón de cuadros) ..... 137

## Lista de información suplementaria

### Capítulo 3

<b>Sup C3.1.</b> ΔDO de los anticuerpos IgG evaluados en 36 residentes norteamericanos sin exposición a <i>Plasmodium</i> spp. en toda la vida y puntos de corte de seropositividad.....	146
<b>Sup C3.2.</b> Valoración del supuesto de linealidad de las variables cuantitativas Edad (A) y episodios previos de malaria (B) .....	148
<b>Sup C3.3</b> Asociación entre las características del individuo y la vivienda con todas las infecciones afebriles por <i>Plasmodium</i> spp. (Microscópicas y submicroscópicas). .....	149
<b>Sup C3.4</b> Asociación entre las características del individuo y la vivienda con todas las infecciones submicroscópicas por <i>Plasmodium</i> spp. ....	151
<b>Sup C3.5.</b> Asociación entre las características del individuo y la vivienda con las infecciones submicroscópicas por <i>Plasmodium</i> spp. que no desarrollaron síntomas durante el seguimiento.....	153
<b>Sup C3.6</b> Seropositividad frente a los anticuerpos IgG con los puntos de corte.....	156
<b>Sup C3.7.</b> Niveles de IgG contra Pf-MSP1 (A), Pf-AMA1 (B), Pv-MSP1 (C) y Pv-121 (D) en muestras positivas para <i>P. falciparum</i> .....	157
<b>Sup C3.8</b> Correlación entre los niveles de anticuerpos IgG anti Pf-MSP1 (A), IgG anti Pf-AMA (B), IgG anti Pv-MSP1 (C), IgG anti Pv-121 (D) y IgM anti Pf.MSP1 (E) en infecciones por <i>Plasmodium</i> spp.....	158
<b>Sup C3.9</b> Correlación entre los niveles de anticuerpos IgG anti Pf-MSP1 (A), IgG anti Pf-AMA1 (B), IgG anti Pv-MSP1 (C), IgG anti Pv-121 (D) y IgM anti Pf.MSP1 (E) solo en muestras positivas para <i>P. falciparum</i> ..	160

### Capítulo 4

<b>Sup C4.1.</b> Cálculo del tamaño de la muestra para un análisis de supervivencia empleando el modelo de riesgos proporcionales de Cox .....	162
<b>Sup C4.2.</b> Dinámica de las infecciones submicroscópicas en el tiempo según la combinación de los resultados de LAMP y microscopia de luz. Muestras que negativizaron la infección (A), que persistieron hasta el final del seguimiento (B), muestras que se perdieron en el seguimiento (C). Los puntos rojos representan cada seguimiento. ML: Microscopía de luz .....	163

<b>Sup C4.3.</b> Estadísticos descriptivos de los niveles de anticuerpos en los individuos con infección submicroscópica .....	170
<b>Sup C4.4.</b> Asociación los niveles de anticuerpos categorizados según el percentil 50 con la negativización de la infección .....	171
<b>Sup C4.5.</b> Valoración del supuesto de riesgos proporcionales basado en los residuales de Schoenfeld .....	172
<b>Sup C4.6.</b> Valoración del supuesto de riesgos proporcionales basado en las curvas log-log para las variables categóricas. Antecedentes de malaria (A), malaria en el último año (B), IgG anti Pf-MSP1 (C), IgG anti Pf-AMA1 (D), IgG anti Pv-MSP1 (E), IgG anti Pv-121 .....	173
Sup C4.7. Alelos microsatélite amplificados en infecciones submicroscópicas del día cero y seguimientos* .....	175

## **Capítulo 5**

<b>Sup C5.1</b> Fechas de captación y número de participantes en cada localidad.....	177
--	-----

## Lista de anexos

### Capítulo 3

<b>Anexo C3. 1.</b>	Formulario de consentimiento informado.....	178
<b>Anexo C3. 2.</b>	Formulario de asentimiento informado.....	184
<b>Anexo C3. 3.</b>	Formulario de datos del individuo.....	187
<b>Anexo C3. 4.</b>	Formulario de datos de la vivienda.....	192
<b>Anexo C3. 5.</b>	Manual de procedimientos en Campo.....	195
<b>Anexo C3. 6.</b>	Acta de aprobación del comité de Ética.....	228

## Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AMA	Antígeno apical de membrana
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CCI	Coefficiente de Correlación Intraclase
EBA 175	Antígeno de unión a eritrocitos 175
DO	Densidad óptica
DE	Desviación estándar
IgG/IgM	Anticuerpos tipo inmunoglobulina G o M
INF- $\gamma$	interferón gamma
IPA	Índice parasitario anual. Expresa la tasa de incidencia malárica anual por cada 1000 habitantes. El IFA y el IVA representan el IPA específico para <i>P. falciparum</i> y <i>P. vivax</i> respectivamente
ML	Microscopía de luz
MSP	Proteína de superficie del merozoito
NAAT	Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos
nPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa anidada
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa

PDR	Pruebas de diagnóstico rápido
qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa
RH5	Homólogo de la proteína de unión a reticulocitos 5
UCV	Unidad de control vectorial
VSA	Antígenos de variantes de superficie

## **Descripción del contenido del manuscrito**

El presente documento contiene cinco capítulos:

El primero de ellos describe el problema de investigación, la hipótesis, los objetivos y la justificación que motivó el desarrollo de la investigación.

En el segundo capítulo se presentan tanto los conceptos teóricos alrededor de la infección por *Plasmodium* spp. y el desarrollo de la malaria como los antecedentes de las investigaciones que de manera directa e indirecta han abordado el problema de las infecciones submicroscópicas.

Los capítulos tres y cuatro contienen los resultados derivados de la presente investigación. Estos capítulos están escritos a manera de artículo; el tercer capítulo da respuesta a los dos primeros objetivos específicos mientras que los resultados producto de los dos últimos objetivos se desarrollan en el capítulo 4.

El quinto capítulo contiene las conclusiones generales de todo el documento y el aporte a la salud pública. Describe además los sesgos y las limitaciones de la investigación y las perspectivas para futuras investigaciones.

Al final del manuscrito hay un apartado general de información suplementaria que proporciona resultados adicionales que permiten aclarar, comprender mejor o profundizar sobre algunos hallazgos de la investigación.



## Resumen

**Introducción:** La prevalencia de las infecciones submicroscópicas varía según la intensidad de transmisión y tienen el potencial de persistir en el tiempo y de contribuir a la transmisión de la malaria. Entender su dinámica es indispensable para desarrollar estrategias de control y eliminación.

**Objetivo:** Determinar la persistencia de las infecciones submicroscópicas afebriles por *Plasmodium* spp. y sus factores asociados en una zona endémica para malaria en Colombia.

**Metodología:** Estudio observacional longitudinal prospectivo. Individuos con infección submicroscópica fueron seguidos por 10 semanas para evaluar el tiempo desde la detección de la infección hasta su negativización mediante la curva de Supervivencia de Kaplan Meier. Se estimó el efecto de los antecedentes de malaria y niveles de anticuerpos en la negativización de la infección mediante un modelo de riesgos proporcionales de Cox.

**Resultados:** La prevalencia de infección por *Plasmodium* spp. detectada por LAMP fue de 9,3% siendo el 74,1% (n=66/89) infecciones submicroscópicas afebriles (6,9%; IC 95% 5,4-8,7%). La tasa de negativización de la infección de 8,5 /100 personas/semana (28 eventos) y una persistencia del 50% de las infecciones submicroscópicas para la semana 9. Se encontró que a medida que incrementan los niveles de anticuerpos IgG Pf-MSP1 y Pv-MSP1 hay una disminución en el riesgo de negativización de la infección (HR= 0,18; IC 95%=0,05-0,63 y HR=0,30; IC 95%=0,12-0,79 respectivamente).

**Conclusión:** Las infecciones submicroscópicas pueden persistir en el tiempo y los altos niveles de IgG se relacionan con dicha persistencia.

**Palabras clave:** infección submicroscópica, infección afebril, persistencia, malaria.

## Abstract

**Background:** The prevalence of submicroscopic infections changes according to the intensity of transmission, and they have the potential to persist over time and contribute to malaria transmission. Understanding its dynamics is essential to develop control and elimination strategies. Aim: To determine the persistence of afebrile submicroscopic infections by *Plasmodium* spp. and its associated factors in an endemic area for malaria in Colombia.

**Methods:** A prospective longitudinal observational study was done. Individuals with submicroscopic infection were followed for ten weeks. The time since the detection of the infection until the clearance of infection was evaluated using the Kaplan Meier survival curve. The effect of malaria history and antibody levels on the clearance of infection was estimated using a Cox proportional hazards model.

**Results:** The prevalence of infection by *Plasmodium* spp. detected by LAMP was 9.3%, being 74.1% (n = 66/89) afebrile submicroscopic infections (6.9%; 95% CI 5.4-8.7%). The clearance of infection rate was 8.5 / 100 people / week (28 events) and a 50% of submicroscopic infections persisted to week 9. We found that as IgG Pf-MSP1 antibody levels increase and Pv-MSP1 there is a decrease in the risk of negative infection (HR = 0.18; 95% CI = 0.05-0.63 and HR = 0.30; 95% CI = 0.12-0, 79 respectively).

**Conclusion:** Submicroscopic infections can persist over time, and high levels of IgG are associated with this persistence.

**Keywords:** submicroscopic infection, afebrile infection, persistence, malaria.

# Capítulo 1

## 1. Introducción

### 1.1. Planteamiento del problema

La malaria es una enfermedad producida por parásitos del género *Plasmodium* y transmitida al humano por la picadura de mosquitos hembra del género *Anopheles* (1). Es considerada un problema de salud pública mundial, más del 40% de la población está en riesgo de adquirir la infección, principalmente por *P. falciparum* y *P. vivax*; las dos especies que mayor morbilidad y mortalidad producen (1, 2).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2017 se registraron en el mundo alrededor de 219 millones de casos de malaria y 435000 muertes (1). Particularmente en la región de las Américas, se reportaron 976000 casos, la mayoría causados por *P. vivax* (74%) (1). En esta región, Venezuela, Brasil, Colombia y Perú fueron los países con mayor carga de la enfermedad (53%, 22%, 8% y 7% respectivamente) (1). En Colombia, se reportaron 63143 casos de malaria en el 2018, el 54% de ellos fueron notificados en la región del Pacífico, siendo el Chocó, el departamento con mayor número de casos (28%), seguido por Nariño (22%); en ambos departamentos, la especie predominante fue *P. falciparum* (3).

Pese a las intervenciones implementadas en el mundo para reducir la carga de la enfermedad, tales como la distribución masiva de mosquiteros impregnados con insecticidas, el tratamiento preventivo con antimaláricos en gestantes, la mayor disponibilidad de pruebas de diagnóstico rápido (PDR) y el acceso oportuno al tratamiento, la malaria continua siendo un problema importante de salud pública. El reporte de la OMS sugiere que, si bien hubo un estimado de 20 millones de casos menos de malaria en 2017 en comparación con 2010, no se han logrado avances significativos en la reducción de los casos de malaria en los últimos tres años (1).

Una de las dificultades para lograr controlar y eliminar la malaria son las infecciones submicroscópicas, denominadas así porque las parasitemias son tan bajas que no son detectables mediante los métodos microscópicos de rutina, como la gota gruesa o el extendido de sangre periférica; además, estas infecciones pueden no ser detectadas con las PDRs; para su detección se requiere el uso de técnicas de amplificación de ácidos

nucleicos (NAAT, por sus siglas en inglés) (4-7). Por lo anterior, uno de los retos para los programas de vigilancia y control, es la identificación oportuna de las infecciones submicroscópicas, ya que no son detectadas por las pruebas de rutina. Lo anterior permite retraso el tratamiento antimalárico, posibilita el desarrollo de consecuencias clínicas y contribuye a mantener la transmisión (6).

Se ha reportado que la microscopía subestima la prevalencia de *Plasmodium* spp. aproximadamente en un 51,0% en comparación con las NAAT (6). La prevalencia de las infecciones submicroscópicas varía según la intensidad de transmisión, siendo mayor en zonas de baja transmisión (8, 9). En infecciones producidas por *P. falciparum*, la prevalencia es del 51,1% en zonas de alta transmisión y llega a 72,2% y 85,4% en zonas de moderada y baja transmisión respectivamente (8). Este comportamiento es similar en las infecciones causadas por *P. vivax* donde las prevalencias son del 58,1%, 72,0% y 70,7% en zonas de alta, moderada y baja transmisión respectivamente (8).

Con relación a las parasitemias, se ha documentado que en comparación con *P. falciparum*, las densidades parasitarias de *P. vivax* son menores dada su preferencia para invadir los reticulocitos, lo que dificulta aún más el diagnóstico de esta especie mediante las pruebas convencionales (10). Adicionalmente, debido a las recaídas sucesivas por *P. vivax*, las cuales son el resultado de la activación de los hipnozoítos en el hígado (11), las parasitemias son más bajas como consecuencia de la adquisición gradual de la inmunidad, lo que obstaculiza aún más la detección del parásito por microscopía (10).

Adicionalmente, la mayoría de las infecciones submicroscópicas cursan sin manifestaciones clínicas aparentes, lo que dificulta aún más el problema ya que estas personas al no sentirse enfermas, no acuden a los puestos de diagnóstico (6) y por lo tanto, no son diagnosticadas ni tratadas. Conviene aclarar que la mayoría de los estudios se refieren a infecciones asintomáticas en los cuales, además de la fiebre, no se descarta la presencia de otros síntomas típicos o atípicos de la infección, por tanto, más que infecciones asintomáticas deberían denominarse infecciones afebriles (12).

Ambas situaciones; las bajas parasitemias y la ausencia de manifestaciones clínicas, ponen de manifiesto la necesidad de usar pruebas más sensibles que la microscopía o las PDRs que permitan

detectar estas infecciones que se sabe, pueden contribuir significativamente a mantener los reservorios de infección y por lo tanto, a perpetuar el ciclo de transmisión (6).

Se ha reportado que las infecciones por *Plasmodium* spp. pueden persistir en el hospedero humano por meses o incluso años, permitiendo la transmisión sostenida del parásito en las zonas endémicas (13). Diferentes series y reportes de caso han demostrado que las infecciones asintomáticas por *P. falciparum* pueden persistir por periodos largos de tiempo; un estudio reportó persistencia hasta por 13 años (14). Algunas de estas infecciones pueden volverse sintomáticas días o semanas después de su detección, y otras pueden resolverse espontáneamente o persistir sin síntomas por meses o incluso años (15-18).

Por otra parte, las infecciones submicroscópicas juegan un papel importante en el mantenimiento de la transmisión, ellas pueden albergar gametocitos que son el estadio sexual del parásito que se transmite desde el humano infectado al mosquito del género *Anopheles* (19). Se ha documentado que los gametocitos de las infecciones submicroscópicas son fuente de infección para los vectores, y que si bien su proporción puede ser más baja en comparación con las infecciones microscópicas, la persistencia de estas infecciones puede contribuir significativamente a la transmisión y propagación de la infección (6). Diferentes estudios han demostrado la capacidad infectiva de los gametocitos de *Plasmodium* spp. de individuos con infecciones submicroscópicas y asintomáticas al vector de la malaria (20-23). En Latinoamérica, la tasa de infectividad de estas infecciones se ha encontrado desde un 1,2% (20) hasta un 5,4% (22). Teniendo en cuenta estos hallazgos, todas las infecciones por *Plasmodium* spp., independiente de su densidad y del tiempo de duración, tienen el potencial de ser fuente de infección para los mosquitos, representando un problema para los programas de control de la malaria.

En Colombia se han realizado diferentes estudios sobre la prevalencia de las infecciones submicroscópicas. Cucunubá *et al.* (2013) reportaron una prevalencia de infecciones por *Plasmodium* spp. detectadas exclusivamente por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, pos sus siglas en inglés) del 5,2% en Tierralta Córdoba y del 4,8% en Tumaco Nariño. Los sujetos con estas infecciones se siguieron hasta por 28 días y ninguno de ellos desarrolló malaria en este periodo (24). Por su parte, Vásquez-Jiménez *et al.* (2016) estimaron una prevalencia de infecciones submicroscópicas entre el 4% al 10% en una serie de

estudios transversales realizados en las municipalidades de Tumaco, Buenaventura y Tierralta entre los años 2011 y 2014 (25). No obstante, en Colombia no hay estudios sobre la persistencia de estas infecciones. Además de identificar la persistencia de las infecciones submicroscópicas y su impacto en la transmisión, conocer los factores involucrados que inciden en la presencia de estas infecciones podrían en conjunto ayudar a comprender más su dinámica, para la posterior implementación de estrategias efectivas de control.

Se puede afirmar que las infecciones submicroscópicas por *Plasmodium* spp. son el resultado de la combinación de una serie de factores que contribuyen a un estado de tolerancia a los parásitos (26). Estos factores no se conocen muy bien, pero es claro que el estado inmune juega un papel clave en el desarrollo de estas infecciones (26, 27). Se ha reportado que algunas condiciones fisiológicas del hospedero, particularmente relacionadas con la respuesta inmune, producto de las exposiciones previas al parásito, limitan el crecimiento de este y controlan el desarrollo de síntomas. Por su parte, hay estudios que sugieren que algunos factores relacionados con el parásito como su virulencia y diversidad genética pueden influir en la presentación de este tipo de infecciones (26, 28). Con relación a los factores propios del hospedero, en malaria se postula que hay desarrollo de una inmunidad anti-enfermedad en la que el individuo puede portar parásitos sin desarrollar síntomas, y en segundo lugar, una inmunidad anti-parasitaria, que limita la cantidad de parásitos, producto del tiempo de exposición. Esto último está relacionado con la edad de los sujetos expuestos y con los antecedentes previos de la enfermedad (29-31).

En este sentido, uno de los principales mecanismos efectores que contribuyen a la protección contra la malaria clínica y a las altas parasitemias, es la adquisición de este tipo de inmunidad con producción de anticuerpos contra diferentes antígenos de los estadios sanguíneos del parásito (32, 33). Sin embargo, la evidencia disponible hasta el momento no es consistente sobre la asociación de los niveles de anticuerpos con las infecciones submicroscópicas (34-39), lo que pone de manifiesto la necesidad de seguir indagando en el rol de la respuesta inmune humoral en estas infecciones.

Finalmente, los factores propios del parásito también juegan un papel importante en el desarrollo de estas infecciones, como la especie que la produce y el amplio repertorio antigénico, que es posible que varíe

durante la transición de una malaria con síntomas y parasitemia detectable, a una infección submicroscópica (26). Se ha documentado que las infecciones por múltiples clones, caracterizadas por una mayor variedad antigénica, favorecen una mayor respuesta de anticuerpos frente a los diferentes genotipos del parásito en comparación con la infección por un solo clon (40). Diferentes estudios han sugerido que las infecciones previas ocasionadas por múltiples clones de *P. falciparum* están asociadas con un menor riesgo de malaria (41-44).

Por otra parte, se ha documentado que los gametocitos de las infecciones producidas por múltiples clones persisten tres veces más en el tiempo que aquellas con un solo genotipo, sugiriendo que la diversidad genética promueve a su vez la persistencia de las infecciones y favorece la presencia de estos reservorios (40).

Por lo anterior, para comprender más ampliamente las implicaciones de la presencia de las infecciones submicroscópicas, no basta solo con conocer su prevalencia, sino su capacidad de persistir en el tiempo y los factores que las condicionan (15). La cronicidad de las infecciones no tratadas es un punto importante en la comprensión y posterior implementación de estrategias de control de la malaria; su presencia puede incrementar el riesgo de transmisión de la infección incluso mayor al riesgo que se espera de los casos de malaria (26). En Colombia, si bien existe evidencia de la presencia de infecciones submicroscópicas, se desconoce si éstas tienen la capacidad de persistir en el tiempo albergando gametocitos y los factores que pueden estar asociados a ellas.

## **1.2. Preguntas de investigación**

¿Por cuánto tiempo persisten las infecciones submicroscópicas afebriles causadas por *Plasmodium* spp. en ausencia de tratamiento antimalárico? y ¿Cuáles son los factores relacionados con la persistencia de las infecciones submicroscópicas afebriles?

## **1.3. Hipótesis**

Las infecciones afebriles submicroscópicas causadas por *Plasmodium* spp. pueden persistir por un periodo de 2 meses y su persistencia está relacionada con los antecedentes de malaria y los altos niveles de anticuerpos IgG anti *Plasmodium*.



#### **1.4. Justificación**

La Estrategia Técnica Mundial contra la Malaria 2016–2030 de la OMS se basa en tres pilares: lograr el acceso universal a la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de la malaria; transformar la vigilancia de la malaria en una intervención básica y acelerar los esfuerzos para lograr la eliminación y alcanzar el estado de libre de malaria. En este último pilar, se refiere a las infecciones asintomáticas por *Plasmodium* spp. como un problema importante de salud pública, ya que muchas personas infectadas permanecen sin síntomas o no son diagnosticadas, contribuyendo a perpetuar el ciclo de transmisión de la malaria (45). Esta estrategia tiene dentro de sus objetivos para el 2030, reducir en un 90% las tasas de mortalidad e incidencia de malaria en todo el mundo en comparación con 2015 y eliminar la malaria para ese mismo año en 35 países que presentaron transmisión activa de la infección en el 2015. Para ello advierte además, que para que las estrategias futuras de control y eliminación logren buenos resultados, hay que tener en cuenta el reservorio de infecciones submicroscópicas (45).

En Colombia, la malaria es considerada una enfermedad desatendida y está contemplada dentro de la dimensión prioritaria “Vida saludable libre de enfermedades transmisibles” del Plan Decenal de Salud Pública 2012-2021 del Ministerio de Salud y Protección Social. El objetivo dentro del plan decenal es lograr reducir la carga de la enfermedad producto de su discapacidad, mortalidad y morbilidad (46). Si bien el plan decenal no se refiere propiamente a las infecciones submicroscópicas por *Plasmodium* spp., para lograr el objetivo propuesto de manera progresiva y sostenida durante el periodo propuesto, es necesario reconocer el impacto de estas infecciones en la transmisión, para poder implementar medidas efectivas de control y eliminación, lo que sustenta la pertinencia del presente trabajo.

Por otra parte, las infecciones submicroscópicas que a su vez son asintomáticas, son frecuentes tanto en zonas de baja como de alta transmisión (10), lo que supone un reto para su identificación porque la microscopía y las PDRs no tienen la sensibilidad suficiente para detectarlas. Adicionalmente, diferentes estudios muestran que estas infecciones juegan un papel importante en el mantenimiento de la transmisión y se ha documentado que en zonas de baja transmisión, las infecciones submicroscópicas son fuente de infección a los mosquitos vectores entre el 20 al 50% (47).

Se requieren más estudios que indaguen sobre la persistencia de estas infecciones en el tiempo y su posible impacto en la transmisión y control de la infección. Por lo tanto, es importante identificar los reservorios de infección submicroscópica, además de sus factores asociados, no solo por la contribución a la comprensión de la dinámica epidemiológica de estas infecciones, sino por la generación de conocimiento útil para el diseño e implementación de medidas que sean aplicables para los programas de control y eliminación de malaria, en la región y en el país.

Para lograr estas metas en el país, se requiere tener en cuenta la dinámica local de la transmisión y determinar si se deben buscar y tratar a las personas asintomáticas, que no acuden a los establecimientos de salud, esto se logra a través de la ejecución de estudios epidemiológicos moleculares que permiten mapear la distribución de las infecciones afebriles submicroscópicas (45). Según el marco para la eliminación de la malaria, esta estrategia solo está indicada cuando la transmisión persiste, a pesar de la intensificación del control de vectores y la implementación de sistemas de vigilancia eficaces (48), sin embargo, teniendo presente que en nuestro medio se han identificado previamente infecciones submicroscópicas en diferentes localidades del país, se requiere la implementación de estrategias como la detección activa de casos. Estas estrategias permitirían localizar a las personas infectadas, que podrían representar un foco en el mantenimiento de transmisión y que no son detectadas por la vigilancia pasiva de casos, bien sea porque viven en áreas remotas y no tienen acceso a los servicios de salud, o porque al estar infectadas y no manifestar los síntomas típicos de la infección no acuden a ellos. Lo anterior podría ser una estrategia útil para interrumpir la transmisión de la malaria en el país.

Con respecto a la necesidad de tratamiento de las infecciones submicroscópicas, en la actualidad no hay consenso y su uso es controversial (49). Mientras algunos autores sugieren que estas infecciones son benignas para el hospedero y ayudan a sostener la inmunidad frente a la enfermedad malárica, otros sugieren que estas infecciones además de ser un reservorio de la infección, están asociadas con inflamación y anemia crónica, lo que puede tener efectos deletéreos para la salud (50-52). No obstante, los efectos de las infecciones submicroscópicas más allá del riesgo de desarrollar la enfermedad clínica, han sido poco explorados (50). Debido a que en este trabajo se aborda el problema de las infecciones submicroscópicas de manera

longitudinal, los resultados obtenidos permitirán orientar la discusión de la pertinencia de tratar o no estas infecciones.

## **1.5. Objetivos**

**1.5.1. Objetivo general.** Determinar la persistencia de las infecciones submicroscópicas afebriles por *Plasmodium* spp. y sus factores asociados en una zona endémica para malaria en Colombia

### **1.5.2. Objetivos específicos.**

- Determinar la prevalencia de las infecciones submicroscópicas afebriles por *Plasmodium* spp.
- Describir las características clínicas, socio-demográficas, antecedentes de malaria y proporción de gametocitos maduros de las infecciones submicroscópicas afebriles por *Plasmodium* spp.
- Estimar el tiempo promedio transcurrido desde la identificación de las infecciones submicroscópicas por *Plasmodium* spp. hasta su negativización.
- Explorar la relación del nivel anticuerpos IgG, IgM y antecedentes de malaria con la persistencia de las infecciones submicroscópicas por *Plasmodium* spp.

## **1.6. Referencias**

1. World Health Organization. (2018). World malaria report 2018. World Health Organization. <http://www.who.int/iris/handle/10665/275867>. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
2. Guerra CA, Snow RW, Hay SI. Mapping the global extent of malaria in 2005. *Trends Parasitol.* 2006;22(8):353-8.
3. Instituto Nacional de Salud. (2018). Informe de Evento Malaria, Colombia, 2018. Instituto Nacional de Salud: FOR-R02.4000-001; [Available from: [https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/MALARIA\\_2018.pdf](https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/MALARIA_2018.pdf)].
4. Lindblade KA, Steinhardt L, Samuels A, Kachur SP, Slutsker L. The silent threat: asymptomatic parasitemia and malaria transmission. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2013;11(6):623-39.
5. Alves FP, Durlacher RR, Menezes MJ, Krieger H, Silva LH, Camargo EP. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and

*Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66(6):641-8.

6. Okell LC, Ghani AC, Lyons E, Drakeley CJ. Submicroscopic infection in *Plasmodium falciparum*-endemic populations: a systematic review and meta-analysis. *J Infect Dis.* 2009;200(10):1509-17.

7. Bousema T, Okell L, Felger I, Drakeley C. Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. *Nat Rev Microbiol.* 2014;12(12):833-40.

8. Meeting report of the WHO Evidence Review Group on Low-Density Malaria Infections. World Health Organization; 2017.

9. Lin JT, Saunders DL, Meshnick SR. The role of submicroscopic parasitemia in malaria transmission: what is the evidence? *Trends Parasitol.* 2014;30(4):183-90.

10. Olliaro PL, Barnwell JW, Barry A, Mendis K, Mueller I, Reeder JC, et al. Implications of *Plasmodium vivax* Biology for Control, Elimination, and Research. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;95(6 Suppl):4-14.

11. Siqueira AM, Mesones-Lapouble O, Marchesini P, Sampaio VS, Brasil P, Tauil PL, et al. *Plasmodium vivax* Landscape in Brazil: Scenario and Challenges. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;95(6 Suppl):87-96.

12. Rodríguez Vásquez C, Barrera Escobar S, Tobón-Castaño A. Low Frequency of Asymptomatic and Submicroscopic Plasmodial Infections in Urabá Region in Colombia. *J Trop Med.* 2018;2018:8506534.

13. Sutherland CJ. Persistent Parasitism: The Adaptive Biology of Malariae and Ovale Malaria. *Trends Parasitol.* 2016.

14. Ashley EA, White NJ. The duration of *Plasmodium falciparum* infections. *Malar J.* 2014;13:500.

15. Tripura R, Peto TJ, Chalk J, Lee SJ, Sirithiranont P, Nguon C, et al. Persistent *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections in a western Cambodian population: implications for prevention, treatment and elimination strategies. *Malar J.* 2016;15(1):181.

16. Szmitko PE, Kohn ML, Simor AE. *Plasmodium falciparum* malaria occurring 8 years after leaving an endemic area. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009;63(1):105-7.

17. Felger I, Maire M, Bretscher MT, Falk N, Tiaden A, Sama W, et al. The dynamics of natural *Plasmodium falciparum* infections. *PLoS One.* 2012;7(9):e45542.

18. Nguyen TN, von Seidlein L, Nguyen TV, Truong PN, Hung SD, Pham HT, et al. The persistence and oscillations of submicroscopic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections over time in Vietnam: an open cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(5):565-72.
19. Andagalu B, Mativo J, Kamau E, Ogutu B. Longitudinal study on *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage following artemether-lumefantrine administration in a cohort of children aged 12-47 months living in Western Kenya, a high transmission area. *Malar J.* 2014;13:265.
20. Alves FP, Gil LH, Marrelli MT, Ribolla PE, Camargo EP, Da Silva LH. Asymptomatic carriers of *Plasmodium* spp. as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon. *J Med Entomol.* 2005;42(5):777-9.
21. Morlais I, Nsango SE, Toussile W, Abate L, Annan Z, Tchioffo MT, et al. *Plasmodium falciparum* mating patterns and mosquito infectivity of natural isolates of gametocytes. *PLoS One.* 2015;10(4):e0123777.
22. Vallejo AF, García J, Amado-Garavito AB, Arévalo-Herrera M, Herrera S. *Plasmodium vivax* gametocyte infectivity in sub-microscopic infections. *Malar J.* 2016;15(1):48.
23. Gouagna LC, Ferguson HM, Okech BA, Killeen GF, Kabiru EW, Beier JC, et al. *Plasmodium falciparum* malaria disease manifestations in humans and transmission to *Anopheles gambiae*: a field study in Western Kenya. *Parasitology.* 2004;128(Pt 3):235-43.
24. Cucunubá ZM, Guerra Á, Rivera JA, Nicholls RS. Comparison of asymptomatic *Plasmodium* spp. infection in two malaria-endemic Colombian locations. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2013;107(2):129-36.
25. Vásquez-Jiménez JM, Arévalo-Herrera M, Henao-Giraldo J, Molina-Gómez K, Arce-Plata M, Vallejo AF, et al. Consistent prevalence of asymptomatic infections in malaria endemic populations in Colombia over time. *Malar J.* 2016;15(1):70.
26. Galatas B, Bassat Q, Mayor A. Malaria Parasites in the Asymptomatic: Looking for the Hay in the Haystack. *Trends Parasitol.* 2015.
27. Le Port A, Cot M, Etard JF, Gaye O, Migot-Nabias F, Garcia A. Relation between *Plasmodium falciparum* asymptomatic infection and malaria attacks in a cohort of Senegalese children. *Malar J.* 2008;7:193.

28. Doolan DL, Dobaño C, Baird JK. Acquired immunity to malaria. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(1):13-36, Table of Contents.
29. Day KP, Marsh K. Naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum*. *Immunol Today.* 1991;12(3):A68-71.
30. Daubersies P, Sallenave-Sales S, Magne S, Trape JF, Contamin H, Fandeur T, et al. Rapid turnover of *Plasmodium falciparum* populations in asymptomatic individuals living in a high transmission area. *Am J Trop Med Hyg.* 1996;54(1):18-26.
31. Trape JF, Rogier C, Konate L, Diagne N, Bouganali H, Canque B, et al. The Dielmo project: a longitudinal study of natural malaria infection and the mechanisms of protective immunity in a community living in a holoendemic area of Senegal. *Am J Trop Med Hyg.* 1994;51(2):123-37.
32. Marsh K, Kinyanjui S. Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunol.* 2006;28(1-2):51-60.
33. Fowkes FJ, Richards JS, Simpson JA, Beeson JG. The relationship between anti-merozoite antibodies and incidence of *Plasmodium falciparum* malaria: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.* 2010;7(1):e1000218.
34. Baum E, Sattabongkot J, Sirichaisinthop J, Kiattibutr K, Jain A, Taghavian O, et al. Common asymptomatic and submicroscopic malaria infections in Western Thailand revealed in longitudinal molecular and serological studies: a challenge to malaria elimination. *Malar J.* 2016;15:333.
35. Villasis E, Lopez-Perez M, Torres K, Gamboa D, Neyra V, Bendezu J, et al. Anti-*Plasmodium falciparum* invasion ligand antibodies in a low malaria transmission region, Loreto, Peru. *Malar J.* 2012;11:361.
36. Vigan-Womas I, Lokossou A, Guillotte M, Juillerat A, Bentley G, Garcia A, et al. The humoral response to *Plasmodium falciparum* VarO rosetting variant and its association with protection against malaria in Beninese children. *Malar J.* 2010;9:267.
37. Andrade BB, Rocha BC, Reis-Filho A, Camargo LM, Tadei WP, Moreira LA, et al. Anti-*Anopheles darlingi* saliva antibodies as marker of *Plasmodium vivax* infection and clinical immunity in the Brazilian Amazon. *Malar J.* 2009;8:121.
38. Leoratti FM, Durlacher RR, Lacerda MV, Alecrim MG, Ferreira AW, Sanchez MC, et al. Pattern of humoral immune response to

*Plasmodium falciparum* blood stages in individuals presenting different clinical expressions of malaria. *Malar J.* 2008;7:186.

39. Gomes LR, Totino PR, Sanchez MC, Daniel EP, Macedo CS, Fortes F, et al. Asymptomatic infection in individuals from the municipality of Barcelos (Brazilian Amazon) is not associated with the anti-*Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositol antibody response. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013;108(6):796-800.

40. Nassir E, Abdel-Muhsin AM, Suliaman S, Kenyon F, Kheir A, Geha H, et al. Impact of genetic complexity on longevity and gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum* during the dry and transmission-free season of eastern Sudan. *Int J Parasitol.* 2005;35(1):49-55.

41. al-Yaman F, Genton B, Reeder JC, Anders RF, Smith T, Alpers MP. Reduced risk of clinical malaria in children infected with multiple clones of *Plasmodium falciparum* in a highly endemic area: a prospective community study. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1997;91(5):602-5.

42. Amodu OK, Oyedeji SI, Ntouni F, Orimadegun AE, Gbadegesin RA, Olumese PE, et al. Complexity of the *msp2* locus and the severity of childhood malaria, in south-western Nigeria. *Ann Trop Med Parasitol.* 2008;102(2):95-102.

43. Färnert A, Rooth I, Svensson, Snounou G, Björkman A. Complexity of *Plasmodium falciparum* infections is consistent over time and protects against clinical disease in Tanzanian children. *J Infect Dis.* 1999;179(4):989-95.

44. Bereczky S, Liljander A, Rooth I, Faraja L, Granath F, Montgomery SM, et al. Multiclonal asymptomatic *Plasmodium falciparum* infections predict a reduced risk of malaria disease in a Tanzanian population. *Microbes Infect.* 2007;9(1):103-10.

45. OMS. Estrategia Técnica Mundial contra la malaria 2016-2030. Programa Mundial sobre Paludismo Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2105 [Available from: [http://www.who.int/malaria/areas/global\\_technical\\_strategy/es/](http://www.who.int/malaria/areas/global_technical_strategy/es/)].

46. MinSalud. Plan Decenal de Salud Pública 2012-2021 Bogotá, Colombia: Ministerio de Salud y Protección Social; 2013 [Available from: <https://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/Plan%20Decenal%20-%20Documento%20en%20consulta%20para%20aprobaci%C3%B3n.pdf>]



47. Okell LC, Bousema T, Griffin JT, Ouédraogo AL, Ghani AC, Drakeley CJ. Factors determining the occurrence of submicroscopic malaria infections and their relevance for control. *Nat Commun.* 2012;3:1237.

48. A framework for malaria elimination. Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

49. Tada MS, Ferreira ReG, Katsuragawa TH, Martha RC, Costa JD, Albrecht L, et al. Asymptomatic infection with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in the Brazilian Amazon Basin: to treat or not to treat? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;107(5):621-9.

50. Peto TJ, Tripura R, Lee SJ, Althaus T, Dunachie S, Nguon C, et al. Association between Subclinical Malaria Infection and Inflammatory Host Response in a Pre-Elimination Setting. *PLoS One.* 2016;11(7):e0158656.

51. Peto TJ, Kloprogge SE, Tripura R, Nguon C, Sanann N, Yok S, et al. History of malaria treatment as a predictor of subsequent subclinical parasitaemia: a cross-sectional survey and malaria case records from three villages in Pailin, western Cambodia. *Malar J.* 2016;15:240.

52. Tosta CE. Coadaptation and malaria control. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102(3):385-404.

## Capítulo 2

### 2. Antecedentes

#### 2.1. Malaria: generalidades y contexto mundial

La malaria es la enfermedad parasitaria de mayor impacto a nivel mundial. Su importancia como problema de salud pública se evidencia en el número de personas afectadas, el impacto en la salud colectiva de las poblaciones, el riesgo de muerte que representan sus complicaciones y las dificultades para su control. Seis especies del género *Plasmodium* pueden infectar al hombre de manera natural y pueden ser considerados como un problema de salud pública; *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. knowlesi* y *P. cynomolgy* (1). *Plasmodium* spp. se transmite al hombre por la picadura de mosquitos infectados del género *Anopheles*, sin embargo, existen otras vías de transmisión, como la vertical y la transfusional (2, 3). *P. vivax* y *P. falciparum* se asocian con mayor frecuencia a morbilidad y mortalidad, siendo esta última la más fatal y predominante en el continente africano. Por su parte, *P. vivax* tiene una mayor distribución geográfica; por fuera del continente africano su proporción es del 50% (4).

La malaria se caracteriza por un amplio espectro de síntomas que van desde fiebre, escalofríos leves y mareos hasta una malaria grave en la que el individuo desarrolla complicaciones como confusión, convulsiones, anemia severa, hipoglicemia aguda y en ocasiones, la muerte (5). En contraste con los individuos que desarrollan un cuadro clínico frente a la infección, sea leve o grave, ciertos individuos infectados con *Plasmodium* spp. no manifiestan síntomas y por lo general tienen infección subpatente o submicroscópica (6), estas infecciones representan la acumulación de una serie de factores que contribuyen a un estado de "tolerancia" a los parásitos (7).

Según la OMS, en el 2017 se registraron en el mundo alrededor de 219 millones de casos de malaria y 435000 muertes. La mayoría de los casos se presentaron en el continente Africano (91,6%), seguido por el Sudeste Asiático (5,2%) y el Mediterráneo Oriental (2%). Particularmente en la región de las Américas se reportaron 976000 casos, la mayoría de los cuales fueron por *P. vivax*. En esta región, Venezuela, Brasil, Colombia y Perú aportaron la mayoría de los casos (53%, 22%, 8% y 7% respectivamente) (8). La tasa de incidencia de malaria a nivel mundial

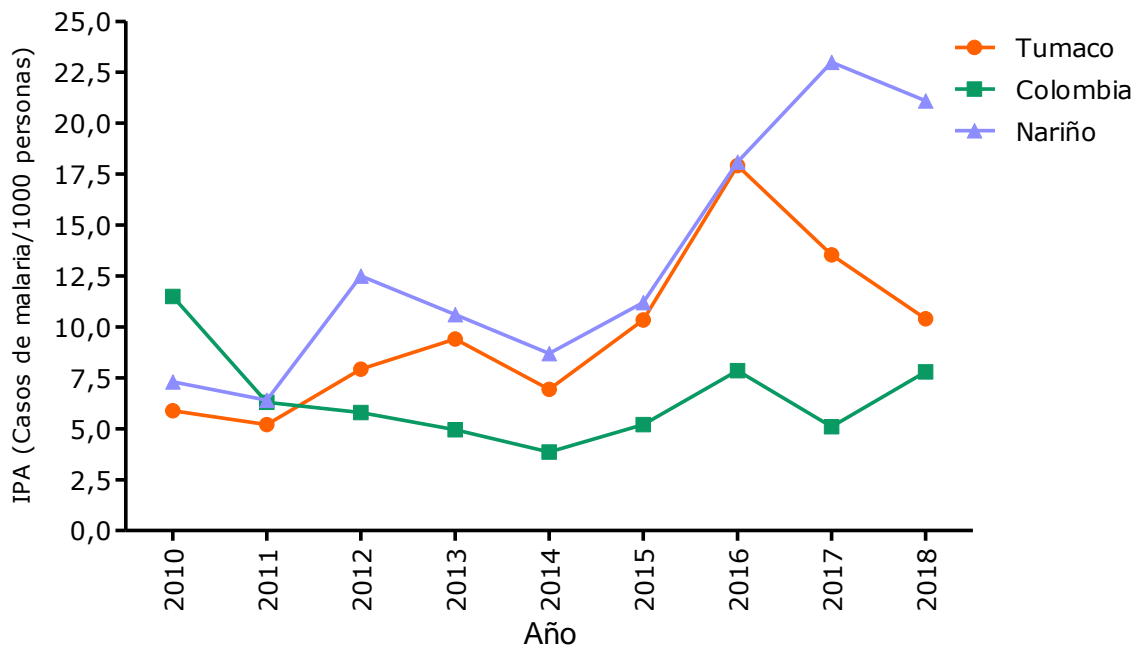
disminuyó entre 2010 y 2017, de 72 a 59 casos por cada 1000 personas en riesgo. Si bien esto representa una reducción del 18% durante éste período, en los últimos tres años el número de casos por cada 1000 personas en riesgo se ha mantenido en 59, sugiriendo que no se han logrado avances significativos en la reducción de los casos de malaria (8).

## **2.2. Malaria en Colombia**

En Colombia, la malaria es un problema importante de salud pública; cerca del 85% del territorio rural presenta las condiciones aptas para su transmisión y el 60% de la población colombiana se encuentra en áreas de riesgo para enfermar o morir por esta causa (9). En el 2018, se notificaron 63143 casos de malaria, 97,5% de ellos fueron casos no complicados; se presentaron además 9 muertes confirmadas por esta causa (9). El 54 % de los casos reportados fueron diagnosticados en la región Pacífica, siendo los departamentos del Chocó y Nariño, los mayores notificadores (27,7% y 21,8% respectivamente) (9).

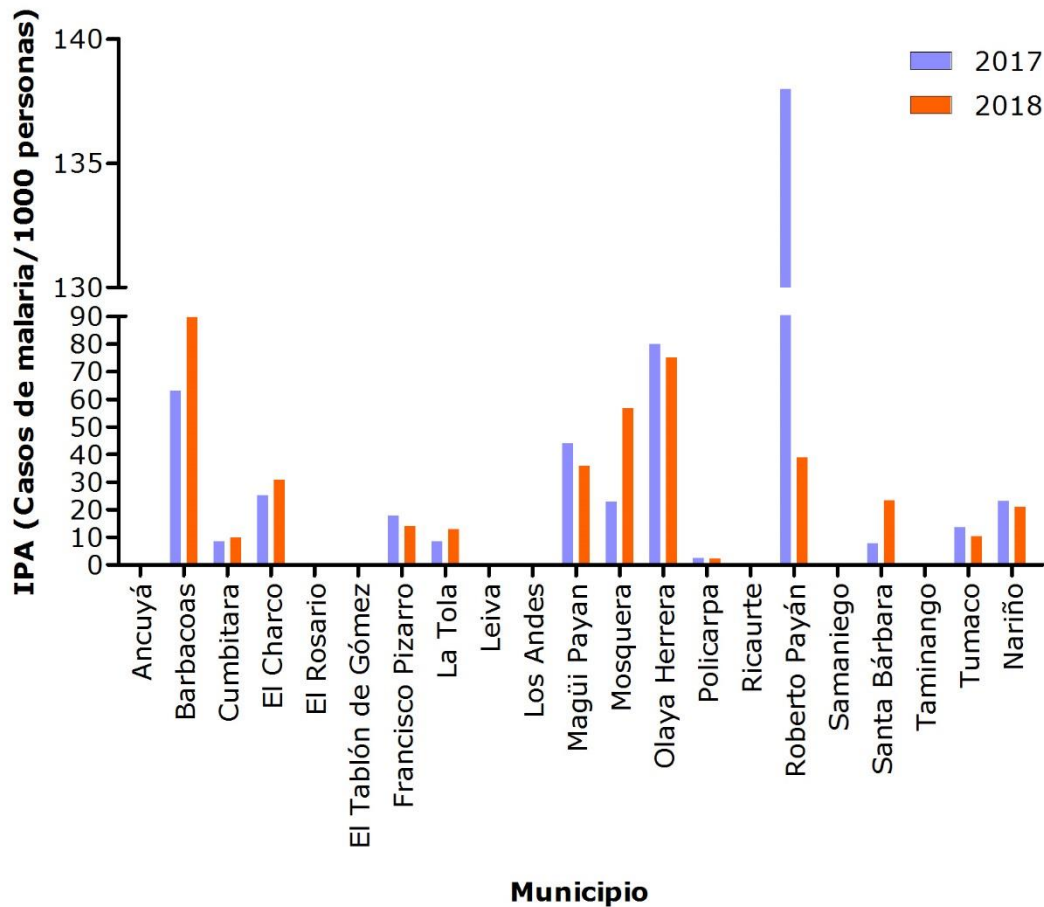
En Colombia, la malaria se presenta en ciclos epidémicos cada 5 a 7 años. El número de casos había logrado disminuir considerablemente pasando de 117637 en el 2010 a 38469 en el 2014, sin embargo, el número de casos reportados ha venido en aumento, aunque levemente en los últimos 4 años (Figura C2.1).

Durante el 2018, Nariño fue el segundo departamento con más casos de malaria no complicada a nivel nacional, siendo *P. falciparum* la especie que mayor número de casos produjo alcanzando un IFA (Índice parasitario anual de *P. falciparum*) de 28,7 en contraste con un IVA (Índice *P. vivax* anual) de 2,0 (9).



**Figura C2.1.** Tasa de incidencia de malaria en Colombia, Nariño y Tumaco desde el 2009 a 2018 (10, 11)

El 32,8% (21/64) de los municipios en el departamento de Nariño presentan transmisión activa de la infección y es clasificado como una zona de alta transmisión con IPAs de 22,9 y 21,1 en 2017 y 2018 respectivamente. Al interior de este departamento, existen diferentes intensidades de transmisión entre los municipios que lo componen, donde Roberto Payán, Olaya Herrera y Barbacoas presentan las mayores incidencias con IPAs que van desde 38,8 a 137,9 entre 2017 y 2018, hasta municipios cuyos IPAs son  $\leq 0,5$  (Ricaurte, Taminango, Ancuyá, Samaniego, El Tablón de Gómez, Leiva, Los Andes y El Rosario) (Figura C2.2). Si bien, en el municipio de Tumaco se reportan IPAs por debajo del nivel departamental (13,5 en 2017 y 10,4 en 2018) (Figura C2.1), este municipio es considerado de riesgo alto según el Instituto Nacional de Salud (IPA > 10) (9); para el 2017 y 2018, aportó el 19,6% y el 16,4% del total de los casos del departamento, respectivamente (10).

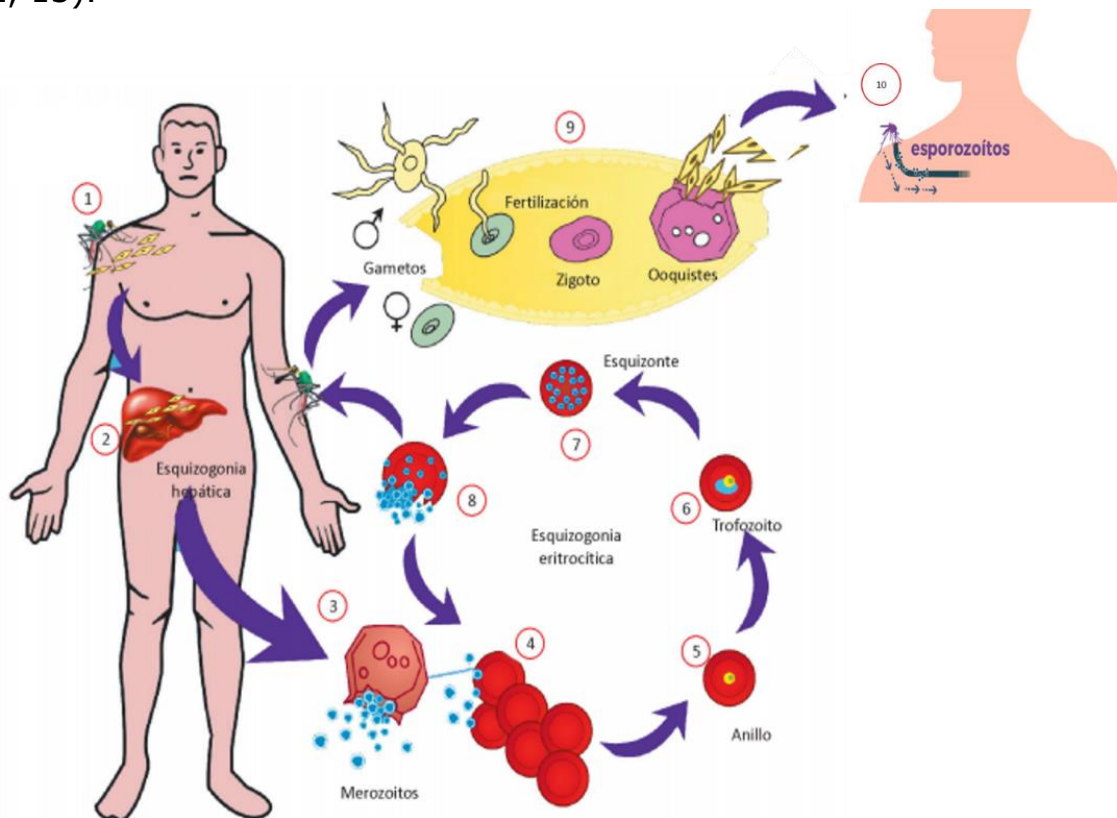


**Figura C2.2.** Casos notificados de malaria en los municipios endémicos del departamento de Nariño, 2017-2018 (10).

### 2.3. Ciclo biológico del *Plasmodium* spp.

*Plasmodium* spp. tiene un ciclo de vida complejo que involucra dos hospederos, un mosquito hembra del género *Anopheles* donde se desarrolla el ciclo sexual del parásito, y que actúa como transmisor del mismo, y un hospedero vertebrado, el hombre, donde se desarrolla el ciclo asexual. El ciclo asexual comprende dos fases; una fase hepática y una eritrocítica, esta última es responsable de la sintomatología y complicaciones de la malaria (12). Un vector infectado inocula al torrente sanguíneo del hospedero vertebrado la forma haploide infectante conocida como esporozoíto [1], estos viajan hasta el hígado donde invaden los hepatocitos [2] y se reproducen asexualmente por esquizogonia, liberando finalmente merozoítos [3] que invaden los

eritrocitos circulantes [4] y dan inicio a la esquizogonia intraeritrocítica pasando por diferentes estadios llamados: anillo [5], trofozoíto [6] y esquizonte [7]. La fase eritrocítica tarda entre 24 y 72 horas, según la especie, y se liberan nuevos merozoítos que invaden otros glóbulos rojos [8]. Algunos parásitos se diferencian durante el ciclo intraeritrocítico a formas sexuales o gametocitos. Estos son ingeridos por el mosquito donde ocurre la fertilización en el intestino del mismo con formación del cigoto. El cigoto se divide formando un ooquiste, de donde se liberan los esporozoítos [9] los cuales migran a las glándulas salivales para esperar la inoculación en la próxima alimentación de sangre [10] (Figura C2.3) (12, 13).



**Figura C2.3** Ciclo de vida de *Plasmodium* spp. (13).

## 2.4. Clínica de la malaria y respuesta inmune

Durante la fase sanguínea de la infección, se desencadena una respuesta inmune exacerbada que produce los síntomas de la malaria (14), pueden presentarse una variedad de presentaciones clínicas que incluyen infección asintomática, enfermedad aguda no complicada, malaria grave

y muerte (15). Los primeros síntomas aparecen entre 7 a 30 días después de adquirir la infección, este periodo de incubación depende del número de parásitos inoculados, la especie de *Plasmodium* y la inmunidad del hospedero (14).

Durante el ciclo eritrocítico, hay una expansión clonal del parásito, con hemólisis masiva que produce un cuadro febril que puede estar acompañado de síntomas como malestar general, fatiga, dolor muscular, de espalda, de cabeza, mareos, pérdida del apetito, dolor abdominal y diarrea. Esta infección aguda es controlada y una infección crónica se establece con parasitemias bajas y episodios intermitentes de fiebre asociados a picos de altas parasitemias (5, 16). Este control de la infección se da a través de una respuesta inmune innata con la producción de interferón gamma (INF- $\gamma$ ) y otras citoquinas pro-inflamatorias que limitan el crecimiento del parásito (5). Una vez instaurada esta respuesta, citoquinas anti-inflamatorias, como la IL-10, participan para controlar esta respuesta, evitar la exacerbación de los síntomas y limitar la extensión de la patología (17). Sin embargo, cuando hay una respuesta inmune intensa y desordenada, producto del desequilibrio entre la respuesta inflamatoria y anti-inflamatoria, este cuadro febril puede avanzar a una malaria grave o complicada caracterizada por otros síntomas como confusión, somnolencia, debilidad extrema, convulsiones, anemia severa, hipoglicemia aguda, falla renal, edema pulmonar, dificultad respiratoria e hiperparasitemia (5).

En las regiones del mundo donde la transmisión de *P. falciparum* es intensa y estable, la malaria grave se presenta en niños en los primeros años de vida, mientras que los niños mayores y adultos son menos propensos a desarrollar complicaciones, gracias a la adquisición de inmunidad que protege contra las manifestaciones clínicas de la infección (18). El 90% de la enfermedad grave y de la mortalidad se concentra en niños menores de 5 años en África sub-sahariana, mientras que, en zonas de menor endemia, la malaria grave ocurre tanto en niños y adultos (18). En general, los individuos que residen en zonas endémicas desarrollan inmunidad no estéril contra la malaria luego de la exposición repetida al parásito, esta inmunidad les confiere protección contra las manifestaciones de la enfermedad pero no elimina todos los parásitos (19, 20).

La inmunidad adquirida naturalmente frente a la infección por *Plasmodium* spp. se divide en dos; una que protege contra las

manifestaciones graves de la malaria (anti-enfermedad) y otra, contra la densidad de parásitos (anti-parasitaria), sin embargo, la inmunidad adquirida nunca es estéril, por esto, gran parte de la población puede mantener una parasitemia crónica de baja densidad que no es detectada por las pruebas de rutina como la gota gruesa (infecciones submicroscópicas) (19). El nivel de inmunidad está determinado por la historia de exposición pasada y por la edad. La inmunidad anti-enfermedad se adquiere durante la infancia temprana y da como resultado una reducción en la malaria grave y la mortalidad. En contraste, la inmunidad anti-parasitaria se adquiere lentamente y confiere protección contra las altas densidades parasitarias, que a su vez protegen contra la forma grave de la enfermedad (20). No obstante, la mayoría de estos estudios donde se ha observado el gradual desarrollo de la inmunidad han sido conducidos en áreas donde la transmisión de malaria es alta y estable (21).

Tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa, así como los mecanismos efectores celulares y humorales son importantes en la protección contra malaria. No obstante, durante la fase eritrocítica, la inmunidad humoral cobra mayor importancia en el control de las parasitemias y la protección contra las manifestaciones clínicas de la enfermedad, tal como se ha demostrado mediante la transferencia pasiva de inmunoglobulina G (IgG) de adultos africanos inmunes a individuos con malaria (22).

Diferentes antígenos de *Plasmodium* spp. son blancos de la respuesta humoral en el humano, incluyendo antígenos expresados en el esporozoíto, el merozoíto y en la superficie del eritrocito infectado (20). Altos niveles de anticuerpos IgG contra antígenos del merozoíto se han asociado con protección frente a la infección sintomática y frente a las altas parasitemias (23-26), en particular, la respuesta contra las proteínas de superficie del merozoíto 1 y 3 (MSP1 y MSP3, por sus siglas en inglés) y frente al antígeno apical de membrana (AMA1, por sus siglas en inglés) (23). Además de la respuesta anti-merozoíto, la respuesta de anticuerpos a antígenos de variantes de superficie (VSA, por sus siglas en inglés) expresados en el eritrocito, se asocia no sólo con protección frente a episodios clínicos y frecuencia de estos, sino también con la progresión a gravedad (27).

Algunos estudios han explorado los mecanismos que controlan las altas parasitemias y la aparición de síntomas en individuos infectados, en



quienes es posible asumir que tienen una respuesta inmune eficaz, la cual controla la infección. Estos estudios han mostrado una asociación potencial entre una mayor cantidad de anticuerpos anti *Plasmodium* con las infecciones asintomáticas en comparación con las sintomáticas (21, 28-30). Baum *et al.* (2015) encontraron que, tanto los individuos con infecciones sintomáticas y asintomáticas tienen evidencia serológica por lo menos a 54 antígenos del parásito, no obstante, identificaron anticuerpos contra las proteínas MSP2, DnaJ y la ATPasa E1E2 ATPase que se asociaron con infecciones submicroscópicas y asintomáticas, y no con las sintomáticas, sugiriendo un patrón de respuesta diferencial entre estos dos grupos (31). Por su parte, Shekalaghe *et al.* (2009) encontraron que los individuos con infecciones submicroscópicas por *P. falciparum*, tienen niveles más altos de anticuerpos anti MSP1 y anti MSP2 en comparación a individuos sanos no infectados (32). Lo anterior sugiere que, los antígenos expresados en el curso de una infección submicroscópica y asintomática podrían ser suficientes para mantener los títulos de anticuerpos (33).

Sin embargo, la asociación entre la respuesta inmune humoral y la infección asintomática no ha sido consistente en todos los estudios (34, 35). Particularmente en un estudio realizado en gestantes en el municipio de Puerto Libertador en Colombia, se encontró que más del 60% de las mujeres tenían anticuerpos contra el antígeno parasitario VAR2CSA, sin embargo, no se observaron diferencias en los niveles de anticuerpos entre las gestantes con infección submicroscópica versus gestantes no infectadas (35). Es probable que las discrepancias encontradas entre los estudios sean producto de las diferencias en la exposición a una gran variedad de antígenos requeridos para la transición de malaria a infección asintomática (7).

Otro aspecto que podría explicar las discrepancias entre la asociación de la respuesta inmune humoral con las infecciones asintomáticas y de baja densidad es la longevidad de los anticuerpos. Varios estudios han sugerido que los anticuerpos contra los antígenos de *Plasmodium* spp. se pierden rápidamente en ausencia de exposición continua; se ha reportado que después de varios meses e incluso semanas posterior a un episodio de malaria aguda, los niveles de anticuerpos IgG específicos para diferentes antígenos de *Plasmodium* spp. disminuyen a muy bajos niveles y en ocasiones, pueden llegar a ser indetectables, pese incluso, a una respuesta inmune inicial sólida (36-39).

No obstante, en contraposición con lo expuesto previamente, otros estudios han mostrado que los niveles de anticuerpos específicos contra *Plasmodium* spp. parecen aumentar de manera gradual con la edad en áreas endémicas (39, 40) y que sus niveles disminuyen a tasas más lentas a medida que incrementa la edad (41). Akpogheneta *et al.* (2008) encontraron que en niños no infectados, los niveles de anticuerpos anti Pf-MSP1, AMA1 y EBA-175 (Antígeno de unión a eritrocitos 175) declinan más lentamente en mayores de 5 años en comparación con los menores de tres años ( $p < 0.05$ ) (41). Lo anterior sugiere que a medida que incrementa la edad y con ello la exposición al parásito, se puede desarrollar una respuesta inmune humoral más sostenida en el tiempo aún en ausencia de infección.

White *et al.* (2014) mediante un modelo matemático y empleando datos de dos estudios de cohorte de niños africanos, estimaron que la respuesta inmune humoral incluye tanto anticuerpos de vida corta (2- 10 días), responsables de responder inicialmente a la infección; y de larga vida (3- 9 años), encargados de mantener la respuesta sostenida en el tiempo (42).

El modelo anteriormente mencionado, fue confirmado en un estudio realizado en individuos que se infectaron con *Plasmodium* spp. en África pero fueron diagnosticados en Estocolmo, área no endémica para malaria. Algunos de estos individuos refirieron haber presentado episodios previos de malaria durante su residencia en África, sin embargo, después de la inclusión al estudio, estos individuos permanecieron en Estocolmo y fueron seguidos por un año para la evaluación de la cinética de los anticuerpos IgG anti AMA1, MSP1, MSP2, MSP3 y RH5 (Homólogo de proteínas de unión a reticulocitos). En este estudio, además de detectar tanto los anticuerpos de corta y larga vida, se encontró que la magnitud de la respuesta IgG es de 2-9 veces mayor en quienes manifestaron haber tenido previos episodios de malaria (43).

En resumen, la evidencia muestra que la longevidad de la respuesta humoral frente a *Plasmodium* spp. depende de la edad y de la exposición previa, que ante una infección se generan anticuerpos de corta y larga vida media y que no se requiere la presencia de *Plasmodium* spp. para mantener tener una respuesta sostenida a lo largo del tiempo.

## **2.5. Identificación de las infecciones por *Plasmodium* spp.**

Las pruebas actualmente disponibles para la identificación de *Plasmodium* spp. incluyen la microscopía de luz (examen de gota gruesa y extendido de sangre periférica), inmuno-cromatografía, PDRs, inmuno-fluorescencia y técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, como la PCR y la amplificación isotérmica (44) entre otras (45).

La gota gruesa que es la prueba estándar para el diagnóstico de la malaria, detecta en condiciones de campo óptimas, entre 50 a 100 parásitos/ $\mu$ L de sangre, sin embargo tiene limitaciones inherentes al operador para detectar infecciones mixtas o con parasitemias muy bajas. Por su parte, las PDRs convencionales tienen un límite de detección alrededor de 200 parásitos/ $\mu$ L de sangre, sin embargo, actualmente hay PDR ultrasensibles (uPDR) que han mostrado tener una sensibilidad dos veces más alta que las convencionales (51,4% versus 25,2% de sensibilidad respectivamente) (46). Se ha reportado no obstante, que el desempeño de las PDRs se afecta por factores genéticos, condiciones de almacenamiento, concentraciones de proteínas en sangre y por delecciones en los genes parasitarios que codifican para las proteínas que detectan estas pruebas, como en el caso de la proteína rica en histidina II (HRP-II, por sus siglas en inglés) (47).

Si bien la microscopía y las PDRs pueden ser útiles para el diagnóstico de individuos con altas o moderadas parasitemias, estas técnicas pueden ser inadecuadas para detectar infecciones de bajas densidades parasitarias (48, 49), sugiriendo que, para conocer la prevalencia real de la infección por *Plasmodium* spp., es necesario emplear métodos con mayor sensibilidad.

El uso de NAAT ha sacado a la luz la magnitud real de la problemática en torno a las infecciones por *Plasmodium* spp. Algunas de estas técnicas puede detectar hasta 0,022 parásitos/ $\mu$ L y permiten la diferenciación de las principales especies de *Plasmodium* (50).

En los contextos de baja transmisión donde la mayoría de las infecciones asintomáticas cursan con bajas densidades parasitarias, la gota gruesa falla en detectar una gran proporción de portadores del parásito (51). Alrededor de dos tercios de los individuos con gota gruesa negativa pueden presentar niveles sub-patentes de parásitos que pueden ser

detectados por PCR, indicando que gran parte de la población puede estar crónicamente infectada con *Plasmodium* spp. (6, 51).

Una revisión sistemática y meta-análisis publicada por Okell *et al.* (2009) evidenció que la detección de la proporción de reservorios submicroscópicos de *P. falciparum* es mayor cuando se emplean métodos de laboratorio altamente sensibles como la PCR y sugiere que la microscopía subestima la prevalencia de infección en un 50,8% (IC 95%: 45%–57%); brecha que es mayor en escenarios de baja endemia (52). Estos resultados son similares a lo reportado en una revisión sistemática sobre las infecciones submicroscópicas por *P. vivax* en donde encontraron que la microscopía identifica un 67% (IC 95%: 59%-73%) menos infecciones en comparación con la PCR (53).

Si bien la PCR proporciona una información más precisa sobre la prevalencia y la distribución de las especies en las zonas endémicas en comparación con la gota gruesa y las PDRs (54), su principal limitación son los altos costos y la infraestructura requerida para el procesamiento de las muestras. No obstante, variantes isotérmicas para la amplificación de ácidos nucleicos (LAMP) surgen como una alternativa con alta sensibilidad para detectar bajas parasitemias (alrededor de 1-5 parásitos/ $\mu$ L) y además tienen la ventaja que se pueden ejecutar en laboratorios con recursos limitados, no requiere equipos sofisticados y los resultados se pueden obtener en pocas horas (44, 55).

## **2.6. Clasificación de las infecciones por *Plasmodium* spp.**

Las clasificación de las infecciones por *Plasmodium* spp. se puede establecer basado en el método de detección de la infección o en la presencia síntomas.

Con respecto al método de detección, las infecciones se pueden clasificar como microscópicas, cuando estas se detectan mediante la gota gruesa, o como submicroscópicas cuando la parasitemia está por debajo del límite de detección de la gota gruesa pero son detectables por NAAT (56).

Adicionalmente, cuando la parasitemia es cuantificada, el grupo de revisión de la evidencia sobre infecciones de baja densidad de la OMS sugiere emplear el término infecciones de baja densidad si la parasitemia es  $<100$  parásitos/ $\mu$ L, la cual debe ir siempre acompañada de una definición del método de cuantificación (56). En su mayoría, las infecciones de baja densidad son a su vez submicroscópicas, no obstante,

se reconoce que, aunque no es frecuente, hay microscopistas expertos que pueden detectar parasitemias por debajo de los 100 parásitos/ $\mu$ L (56).

Con respecto a la presencia de los síntomas, la infección por *Plasmodium* spp. se puede clasificar como sintomática o asintomática. Los signos y síntomas de malaria no son específicos y se sospecha clínicamente de esta entidad sobre la base de fiebre o historia de fiebre (57). Si bien la fiebre es considerada el signo cardinal en malaria (58, 59) ya que cerca del 95% de los pacientes la presentan (60, 61), hay otros síntomas frecuentes como los dolores de cabeza (49,0-70,6%), las artralgias/mialgias (41,0%), los escalofríos (40,0-93,0%), vomito (23,-29,40%), diarrea (18-29,4%), entre otros (60, 61). Desafortunadamente no existe una combinación de signos o síntomas que permitan identificar de manera confiable un paciente con malaria de otra causa, y por ello se hace necesario, la identificación del parásito (57).

Actualmente, no hay consenso en la definición de las infecciones asintomáticas por *Plasmodium* spp. Usualmente en las publicaciones, estas infecciones son referidas como "malaria" asintomática (62-64), lo cual es impreciso si se tiene en cuenta que la definición de malaria per se, abarca el espectro de síntomas producto de la infección por *Plasmodium* spp. Por otro lado, en muchos de estos estudios, al referirse al término "asintomático" usualmente incluyen participantes en los que además de la fiebre, no se descarta la presencia de otros síntomas típicos o atípicos de la infección, por lo tanto, más que infecciones asintomáticas deberían denominarse infecciones afebriles (65). Lo anterior no desconoce que existen infecciones que si bien no cursan con fiebre, pueden cursar con otros síntomas relacionados con la infección (infecciones oligo-sintomáticas) (66) la cuales no podrían considerarse propiamente como infecciones asintomáticas. Sin embargo, puede ser difícil establecer si estos síntomas están directamente relacionados con la infección por *Plasmodium* spp. o pueden ser el producto de otra enfermedad subyacente (57).

Finalmente, es importante aclarar que la clasificación de la infección basada en las pruebas diagnósticas es independiente de la basada en la presencia de síntomas, pudiendo existir por ejemplo infecciones microscópicas sintomáticas o asintomáticas. No obstante, algunos autores sugieren que para clasificar una infección, bien sea microscópica o submicroscópica como asintomática, se requiere de un periodo de

seguimiento (correspondiente al periodo de incubación propio de cada especie de *Plasmodium*) para descartar que la infección detectada no esté en periodo de incubación y posteriormente desarrolle los síntomas (64). No obstante, tampoco hay consenso sobre la longitud de este seguimiento pues hay que tener presente que, una vez el parásito es identificado en sangre significa que el ciclo hepático, el cual hace parte del periodo de incubación, ya se ha completado y por lo tanto, el seguimiento de estas infecciones no debería ser igual de extenso al periodo de incubación, más aún si se tiene en cuenta que la fase hepática es la más extensa en esta etapa de la infección.

## **2.7. Contexto mundial y nacional de las infecciones submicroscópicas**

La prevalencia de las infecciones submicroscópicas varía según la intensidad de transmisión siendo mayor en zonas de baja transmisión (Tabla C2.1) (56, 63). Existe una gran cantidad de reportes de la prevalencia en las diferentes regiones endémicas en el mundo y en diferentes poblaciones.

En el continente africano donde hay predominio de *P. falciparum*, la proporción de estas infecciones varía según la intensidad de transmisión de la zona. En un estudio realizado en Etiopía, en donde la prevalencia de malaria disminuyó hasta en un 60%, se reportó una prevalencia de 9,7% de infección submicroscópica afebril (67). De manera similar en Gabón, se reportó una prevalencia de 10,1% de infecciones submicroscópicas en personas portadoras del virus de la inmunodeficiencia humana (68).

En Asia también hay reportes variables de este tipo de infecciones. En Cambodia, la prevalencia de infección submicroscópica mediante una PCR ultrasensible (uPCR) fue del 8,2% (69). Por su parte, en una zona de baja transmisión en Tailandia se reportó una prevalencia de infección submicroscópica del 2,8% (70). Adicionalmente, en un estudio realizado en Punjab, la prevalencia de infección submicroscópica fue del 23,4% cuyo diagnóstico molecular fue hecho con un PCR anidada (npCR por sus siglas en inglés) (71).

**Tabla C2.1** Proporción de infecciones por *Plasmodium* spp. que son submicroscópicas según nivel de transmisión (56)

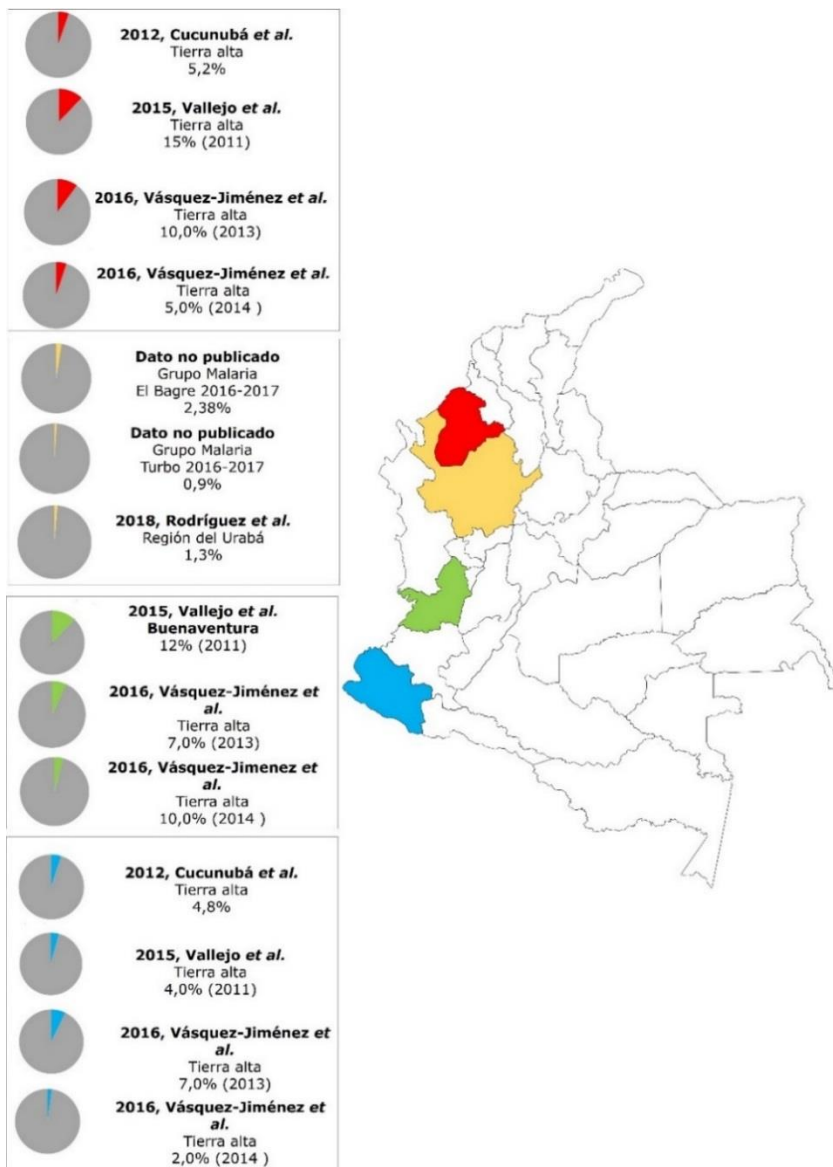
Especie	Transmisión*		
	Baja 0-10%	Moderada 10-20%	Alta* >20%
<i>P. falciparum</i>			
Numero de estudios	9	1	8
Media no ponderada† (RI)	75,0% (77,3–90,4)	NA	56,7% (51,4–63,6)
Media ponderada‡ (IC 95%)	85,4% (81,5–88,7)	72,2 (67,4–76,6)	51,1% (48,7–53,5)
<i>P. vivax</i>			
Numero de estudios	29	20	15
Media no ponderada† (RI)	82,5% (68,0–100)	72,6% (59,2–90,7)	57,2% (50,0–73,8)
Media ponderada ‡ (IC 95%)	70,7% (67,5–73,8)	72,0% (70,2–73,7)	58,1% (56,3–59,8)

*Tabla traducida de la referencia 56. Los datos fueron tomados de estudios publicados y no publicados que evaluaron la parasitemia de P. falciparum y P. vivax con NAAT. \*La intensidad de transmisión se clasificó según la prevalencia de infección detectada por NAAT. \*Se calculó tomando el promedio sin procesar de todos los estudios, independientemente del tamaño de muestra. ‡ Se calculó tomando el promedio de todos los estudios, pero teniendo en cuenta el tamaño de muestra*

En el continente americano se han reportado prevalencias de infecciones submicroscópicas por *P. vivax* entre el 0,3% hasta el 31,3% (53). En regiones de Brasil hipo-endémicas y meso-endémicas para malaria, entre la mitad y tres cuartas partes de las PCR's positivas para *Plasmodium* spp. no son identificadas por la gota gruesa (72). En Remansinho, una población de la región amazónica de Brasil se realizó un estudio para describir la epidemiología de la malaria; los resultados mostraron que el 56,6% de las infecciones por *P. vivax* fueron asintomáticas y el 32% fueron tanto asintomáticas como submicroscópicas (73). En este mismo país, en localidades cercanas al Parque Nacional Jaú se reportaron frecuencias de infección submicroscópica por grupos de edad, encontrándose que a mayor edad, mayor frecuencia de estas infecciones (<5 años: 0%; 5-10: 84,6%; 11-15, 86,9%; 16-30 años: 69,2%; >30: 92,9%) (74).

En Colombia se han realizado estudios de prevalencia de estas infecciones en diferentes regiones endémicas. En Tierra Alta (Córdoba) se reportó una prevalencia de infecciones asintomáticas detectadas por PCR del 16,5% y del 5,8% en Tumaco, ambas al ingreso al estudio. No obstante, después de 28 días de seguimiento, las prevalencias de estas infecciones disminuyeron a 6,6% y 3,4% respectivamente (75). Vásquez-Jiménez *et al.* (2016) y Vallejo *et al.* (2015) reportaron una prevalencia de infecciones submicroscópicas entre un 4% a un 10% en una serie de estudios transversales realizados en las municipalidades de Tumaco, Buenaventura y Tierralta entre los años 2011 y 2014 (76, 77). Por su parte, en el Urabá antioqueño se reportó una frecuencia de infecciones submicroscópicas del 1,3% (65) y estudios recientes realizados en el grupo malaria encontraron una prevalencia de estas infecciones del 2,4% en el Bajo Cauca y del 0,9% en el municipio de Turbo (Datos no publicados) (Figura C2.4).





**Figura C2.4.** Prevalencia de las infecciones submicroscópicas en Colombia.

*Elaboración propia con datos tomados de referencias 65 a 68 (65, 75-77). En el mapa, los colores representan los departamentos en donde los estudios fueron realizados, en Rojo Córdoba, en amarillo Antioquia, en verde Valle del Cauca y en Azul Nariño. A su vez, estos colores representan en los gráficos de pastel las proporciones de las infecciones submicroscópicas.*

Todos estos estudios de prevalencia, en conjunto indican que las infecciones submicroscópicas por *Plasmodium* spp. están ampliamente distribuidas en el mundo, que éstas no siempre son asintomáticas y que sus prevalencias pueden variar dependiendo de las localidades y de las NAAT empleadas. Este último aspecto es importante debido a que los límites de detección de las pruebas moleculares empleadas hoy día para identificar las infecciones por *Plasmodium* spp. varían considerablemente (0,002-5 parásitos/uL) (44). Esta variabilidad está relacionada con muchos aspectos como el tipo y volumen de material usado (ADN, ARN o sangre completa), el gen que se amplifica, el número de especies detectadas en un ensayo, la composición y concentración de cebadores o sondas, la técnica de amplificación, el tipo de lectura (electroforesis en gel, detección de fluorescencia, flujo lateral), entre otros (78). Todo lo anterior dificulta la comparación entre los estudios, incluso en una misma región.

No obstante, independiente del método diagnóstico empleado, la detección de infecciones submicroscópicas es una prioridad. Estas infecciones se consideran una fuente de transmisión constante de la infección, que dificulta el éxito de los programas de control y eliminación, principalmente en zonas endémicas con baja prevalencia (<10-20%) (79). Por último, pueden conllevar a riesgos para la salud de las poblaciones como anemia, mortalidad materna y neonatal, coinfecciones bacterianas, discapacidad cognitiva, entre otros (80).

## **2.8. Factores condicionantes de la infección por *Plasmodium* spp.**

La malaria es una enfermedad compleja en donde interactúan factores relacionados no sólo con el parásito y el vector, sino también con el individuo susceptible y el medio ambiente donde este interactúa (81). Con respecto a los factores propios del hospedero, existen unos relacionados directamente con el riesgo de infección, de enfermar y otros de presentar complicaciones.

La ocupación al aire libre por ejemplo se ha relacionado con un incremento en el riesgo de infectarse debido a que hay mayor posibilidad de ser picado por mosquitos infectados (OR=4,2; IC 95%= 2,4-7,6) (82, 83). También se ha evidenciado que un bajo índice de riqueza (OR=5,68; IC 95%=4,46-7,25) (84), el tamaño de la vivienda, referido como más de 7 personas por casa (OR=1,50; IC 95%=1,26-1,78) (84), la cercanía de la

vivienda a los cuerpos de agua (OR=1,59; IC 95%=1,11-2,29) (85), entre otros (83-85) se han asociado con un incremento en la posibilidad de infectarse con *Plasmodium* spp. y enfermar. Por su parte, se ha evidenciado que a mayor edad hay mayor riesgo de enfermar (OR= 3,62; IC 95%= 2,43-5,40 en menores de 5 años) (86).

Con relación a los factores asociados a la malaria grave, la duración de los síntomas antes de buscar asistencia médica mayor a dos días se han relacionado con un incremento en las complicaciones (OR= 5,38; IC 95%=1,90-15,19). Por su parte, el tiempo transcurrido antes de recibir tratamiento antimalárico también se ha asociado con complicaciones (OR=3,82; IC 95% 1,44-10,12) (87).

En cuanto a los factores genéticos del hospedero, se ha evidenciado que la presencia de polimorfismos del glóbulo rojo se asocia con una disminución en el riesgo de presentar un episodio de malaria, tales como las hemoglobinopatías Hb-AA (OR=0,21; IC= 0,06-0,73) (88) y la deficiencia de la Glucosa-6-fosfato-Deshidrogenasa (RR=0,48; IC 95% 0,31-0,75) (89).

Asimismo existen factores propios del parásito como la virulencia, la capacidad de resistencia a los medicamentos y la especie, que influyen en el curso de la enfermedad (18). Por ejemplo, la enfermedad grave y la mortalidad por malaria son principalmente atribuidas a la infección por *P. falciparum*, en tanto que *P. vivax* puede ser causante de complicaciones, pero en menor proporción.

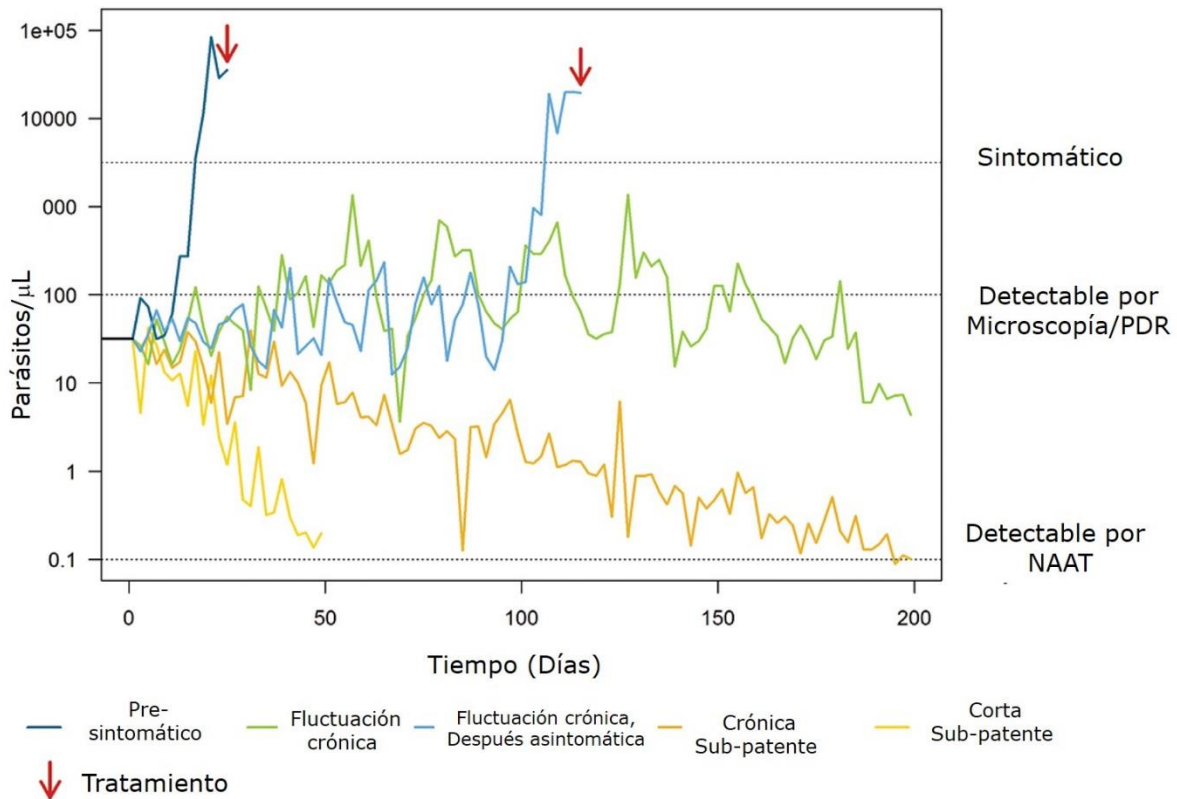
Pese a la gran cantidad de estudios sobre los factores asociados a la infección por *Plasmodium* spp. y a malaria, poco se sabe acerca de los factores propiamente relacionados con las infecciones submicroscópicas. Cucunubá *et al.* (2013) reportó que ser hombre y tener más de un episodio previo de malaria incrementa la posibilidad de tener infecciones asintomáticas y submicroscópicas (OR=2,5; IC 95% 1,0-6,7 y OR=3,0; IC 95% 1,0-9,4 respectivamente) (75). Por su parte, Pava *et al.* (2016) indicaron que quienes no usan mosquiteros y tienen más de 5 años de edad tienen un mayor riesgo de tener infección submicroscópica (90). No obstante en este estudio se encontró que ser mujer incrementa la posibilidad de tener este tipo de infecciones (90), discrepando con los hallazgos previos (75). Se requiere por lo tanto, mayor evidencia de los factores directamente relacionados con las infecciones submicroscópicas.

## **2.9. Persistencia de las infecciones por *Plasmodium* spp.**

La mayoría de los estudios que abordan el tema de las infecciones submicroscópicas y asintomáticas han tenido una mirada transversal de la situación, lo cual ha permitido evidenciar la magnitud del problema, no obstante, para comprender la importancia de estas infecciones y su impacto en la transmisión, es necesario conocer cómo se comportan estas infecciones en el tiempo, las variaciones en las densidades parasitarias, su potencial infectivo, las consecuencias inmunológicas, y los cambios en el estado de salud que pueden generar en el hospedero a corto y a largo plazo.

Drakeley *et al.* (2018), propusieron que una persona con infecciones de baja densidad y asintomáticas pueden presentar diferentes desenlaces como lo es desarrollar malaria, permanecer crónicamente infectado o eliminar la infección (Figura C2.5) (91).

Ayudando esta teoría, la evidencia muestra que en zonas de alta transmisión, las infecciones asintomáticas que muchas veces son microscópicas, pueden persistir por semanas a meses, gracias a la inmunidad que controla la parasitemia sin aparición de síntomas (63). No obstante, el tiempo de duración de las infecciones asintomáticas en zonas de baja endemia, que son principalmente submicroscópicas, ha sido menos estudiado. Diferentes series y reportes de caso han demostrado que las infecciones por *Plasmodium* spp. pueden persistir hasta por 13 años (92), y los pocos estudios de cohorte que han evaluado su persistencia muestran que estas infecciones pueden volverse sintomáticas días o semanas después de su detección, algunas pueden resolver por sí mismas y otras pueden persistir sin síntomas por meses o incluso años (93-95).



**Figura C2.5.** Trayectorias hipotéticas de las infecciones submicroscópicas -Traducido de Drakeley *et al.*, 2018 (91)- *Una infección submicroscópica puede tener varios desenlaces potenciales: puede ser una infección de baja densidad persistente (línea naranja) o de corta duración (línea amarilla), y sin desarrollar síntomas, podría estar en la etapa pre-sintomática (línea azul oscura) o experimentar un lento aumento en la densidad del parásito hasta que se desarrollen los síntomas (línea azul clara), las parasitemias también podrían fluctuar entre niveles detectables e indetectables por microscopía a lo largo del tiempo, sin síntomas (línea verde).*

En Brasil, se encontró que tres cuartas partes de los individuos con infección asintomática y submicroscópica eliminan la infección en el transcurso de dos semanas, mientras un tercio de ella puede permanecer con parasitemia submicroscópica hasta por un mes (96). En un estudio realizado en Colombia, se encontró que 100% de las infecciones asintomáticas y submicroscópicas detectadas permanecieron positivas hasta el día 28 de seguimiento sin desarrollo de síntomas (75).

En un estudio realizado en Tailandia, se reportó que 13% de los individuos con infecciones submicroscópicas por *P. falciparum* permanecieron positivos por 2 a 4 meses y el 87% se negativizó durante el primer mes de seguimiento. Por el contrario, encontraron que un tercio de las infecciones por *P. vivax* persistieron por más de 6 meses (93). Por su parte, Barbosa *et al.* (2015), en un estudio realizado en Brasil encontraron que el 17% de las infecciones submicroscópicas que a su vez fueron asintomáticas progresaron a enfermedad clínica después de 6 semanas de seguimiento y fueron detectadas por la gota gruesa (73). En este mismo estudio además se identificó que todas las infecciones submicroscópicas tenían gametocitos, el estadio del parásito responsable de la transmisión al mosquito vector, indicando que estas infecciones además de persistir por semanas podrían contribuir significativamente a la transmisión del parásito dificultando a su vez, la eliminación de la malaria (73).

Otro estudio de persistencia realizado en Vietnam mostró que la mediana de la duración de las infecciones por *P. falciparum* es de 2 meses (RI 1–3 meses) mientras que para *P. vivax*, la duración fue mayor (6 meses; RI 3-9 meses) (97). Las densidades parasitarias en estas infecciones variaron considerablemente a lo largo del tiempo (87). La Tabla C2.2 resume los principales hallazgos de los estudios mencionados anteriormente.

**Tabla C2.2.** Resumen de los principales estudios sobre persistencia de las infecciones por *Plasmodium* spp.

Ref.	Lugar/ Endemia	Población	n	Especie	Gen/PCR	Seguimiento	Resultado
(83)	Tailandia/ Baja	≥16 años edad	136	18% <i>P. falciparum</i> 25% <i>P. vivax</i> 57% <i>Plasmodium</i> spp.	ARNr 18S/uPCR	Mensual año)	87% de las infecciones por <i>P. falciparum</i> eliminaron en el primer mes, el 13% restante persistieron entre 2-4 meses.  (1 44% de las infecciones por <i>P. vivax</i> eliminaron entre el primer y segundo mes.  <i>35% de las infecciones por P. vivax/ Plasmodium spp. Persistieron por 4 o más meses</i>
(87)	Vietnam/ Baja	≥6 meses edad	356	36% <i>P. falciparum</i> 27% <i>P. vivax</i> 25% <i>mixta</i> 12% <i>Plasmodium</i> spp.	ARNr 18S/uPCR	Mensual (2 años)	Las infecciones por <i>P. falciparum</i> tienen un promedio de persistencia de 2 meses (RI 1-3meses) mientras que el promedio para <i>P. vivax</i> es mayor; 4 meses (RI 3 -9 meses) No se describe el porcentaje de eliminación de la infección
(63)	Brasil/ Baja	Infección asintomática submicroscópica	8 Estudios transversales 150 187 198 199 197 177 199 169	<i>P. vivax</i>	ARNr qPCR	18S/ Cada 4 meses en los primeros 4 estudios y cada 6 meses en los últimos 4	11% de las infecciones persisten al siguiente estudio transversal  17% desarrolló síntomas en las primeras 6 semanas de ser detectadas
(65)	Colombia/ Baja	>2 años, afebriles, infección asintomática submicroscópica	21	<i>P. vivax/P. falciparum</i> No se especifica la proporción en infecciones submicroscópicas	ARNr 18S/nPCR	Días 14 y 28	100% de persistencia al día 28

Por su parte, Slater *et al.* (2019), en una revisión sistemática cuyo propósito fue entender la dinámica temporal de las infecciones subpatentes (infecciones detectadas por una NAAT y negativa para la prueba empleada en campo, microscopía o PDR), analizaron 7 cohortes y encontraron que en el 30% de las personas con infecciones submicroscópicas no había detección del parásito en muestras subsecuentes. Los autores concluyeron que probablemente muchas de estas infecciones son de vida corta o son infecciones que fluctúan por debajo de los límites de detección de las NAAT. Con respecto a las fluctuaciones de las parasitemias, un hallazgo importante de esta revisión fue que muchos individuos en las diferentes cohortes presentaron una o más muestras positivas por microscopía (98). No obstante, los autores en esta revisión no pudieron estimar la duración de las infecciones submicroscópicas porque no habían suficientes datos, ya que en algunas de las cohortes se administró tratamiento al identificarse la infección, la periodicidad de los seguimientos fue heterogénea y porque la genotipificación del parásito no se realizó.

### **2.10. Impacto de las infecciones submicroscópicas en la transmisión**

Los gametocitos son el único estadio del parásito que puede transmitirse desde los humanos a los mosquitos y por lo tanto son los responsables de la transmisión de la malaria. En zonas de alta transmisión hasta un 40% de las personas con síntomas de malaria pueden presentar gametocitos, detectados por microscopía antes de iniciar el tratamiento (99). En Colombia, considerada zona de baja endemia, la frecuencia de gametocitos al momento del diagnóstico es variable (7% - 22%) (100). Existen diferencias en la gametocitogénesis de acuerdo a la especie de *Plasmodium*. Los gametocitos de *P. falciparum* aparecen en circulación a los 8-10 días después del primer episodio de fiebre, mientras que en *P. vivax* aparecen más temprano (6-7 días) (101). Los estadios maduros de los gametocitos de *P. falciparum* pueden estar en circulación por un promedio de 6,4 días o hasta por 6 semanas, a niveles submicroscópicos en la mayoría de los casos, aún después de ser tratados (102).

La identificación de gametocitos se hace de rutina con parámetros morfológicos, mediante microscopía. Sin embargo, este método no es el más sensible para determinar la frecuencia real de gametocitos en poblaciones infectadas, pues en muchos casos sus niveles están por debajo del límite de detección de la microscopía. El uso de métodos



moleculares basados en la detección de transcritos expresados en los gametocitos, ha evidenciado que ser portador submicroscópico de estas formas sexuales es común en todas las áreas endémicas (51).

La gran mayoría de infecciones bien sean sintomáticas o no, microscópicas o submicroscópicas, involucran gametocitos circulantes que pueden infectar mosquitos aun a bajas parasitemias, por lo tanto, todas las infecciones tienen el potencial de contribuir a la transmisión del parásito (51).

Al parecer, existe relación entre ser asintomático y portar gametocitos. Varios estudios han mostrado que la presencia de gametocitos de *P. falciparum* se asocia de forma positiva con la ausencia de síntomas y con bajas densidades parasitarias (103, 104). Estos hallazgos sugieren como hipótesis que ciertos factores inflamatorios e inmunes relacionados con las infecciones sintomáticas pueden afectar negativamente la producción de gametocitos (64, 105).

Schneider *et al.* (2007) indicaron que los individuos con gametocitemias microscópicas y submicroscópicas (detectadas por *Pfs25* QT-NASBA) contribuyen en proporciones similares a la transmisión de la malaria por *P. falciparum*. Los autores reportaron que el 70% de los individuos con gametocitemia submicroscópica fueron capaces de infectar por lo menos un mosquito *An. Stephensi*, y aunque los individuos con estas infecciones infectaron menos mosquitos, la gametocitemia es más frecuente que en individuos con infección microscópica, resultando en una contribución estimada similar en ambos grupos del 45,3% (106). De manera interesante, de 25 niños a quienes no se les detectaron gametocitos ni por microscopía ni por QT-NASBA, 8 (32,0%) fueron infecciosos para los mosquitos en los ensayos de alimentación por membrana (106), sugiriendo que gametocitemias muy bajas, no detectadas incluso por PCR, pueden eventualmente contribuir a la transmisión.

En Brasil, se reportó una tasa de infectividad para *An. darlingi* del 1,2% de parásitos aislados de portadores submicroscópicos-asintomáticos. Aunque solo 3/15 (20%) de estos individuos tenían infección con *P. vivax*, las infecciones que se identificaron por nPCR en los mosquitos, correspondían a esta especie. Por su parte, la tasa de infectividad en los portadores sintomáticos fue del 22%. Pese a la diferencia en estas tasas de infectividad, es importante tener en cuenta que las infecciones submicroscópicas además de ser frecuentes en zonas endémicas, pueden

permanecer por mucho tiempo en los individuos sin ser detectadas por la técnicas diagnósticas de rutina, y en consecuencia, su presencia puede tener un impacto importante en el mantenimiento de la infección (107). En Colombia, un estudio mostró que los portadores submicroscópicos-asintomáticos de *P. vivax*, presentan proporciones incluso mayores de gametocitos maduros (Pvs25-qPCR) que su contraparte sintomática. Sin embargo, al igual que en Brasil, las infecciones sintomáticas agudas revelaron una mayor proporción de mosquitos infectados (desarrollo de ooquistes) que las infecciones submicroscópicas-asintomáticas (57,0 Vs. 4,2% respectivamente). Posibles explicaciones a este resultado obedezca a que en las infecciones microscópicas hay una mayor cantidad absoluta de gametocitos maduros y que en estos haya una adecuada razón de micro/macro gametocitos, esto último no fue evaluado en dicho estudio (108). En general estos estudios muestran que, en términos de mantenimiento de la transmisión, la presencia continua del vector y de individuos infectados (microscópicos o submicroscópicos) en regiones endémicas, parece ser suficiente para el mantenimiento de la infección a nivel comunitario.

Adicionalmente, un estudio reciente estimó que la densidad de gametocitos en las infecciones solo detectadas por uPCR está por debajo de 1 gametocito/uL, las cuales tienen poca probabilidad de ser infectivas para los mosquitos (49). Lo anterior pone de manifiesto que si bien es necesario identificar las infecciones submicroscópicas, no es necesario el empleo de técnicas muy sofisticadas que si bien pueden detectar más infecciones, probablemente no tendrán un impacto en la transmisión, además que son más costosas, laboriosas y requieren que se tomen mayores volúmenes de sangre (49). No obstante, debido que las parasitemias pueden fluctuar en el tiempo (93, 97, 98) no se puede descartar la contribución de estas infecciones a la transmisión (109).

### **2.11. Consecuencia para la salud humana**

Sumado a las implicaciones en el mantenimiento de la transmisión del parásito en zonas endémicas, las infecciones submicroscópicas, que en zonas de baja transmisión son en su mayoría asintomáticas, pueden ser responsables de efectos adversos en el hospedero, sin embargo, la relevancia clínica de este tipo de infecciones ha sido poco explorada (110).

La anemia y la trombocitopenia son importantes problemas de salud en las regiones endémicas para malaria y son responsables de morbilidad y

muerte, principalmente en niños. Se ha reportado en niños africanos que las infecciones asintomáticas cursan con una disminución en los niveles de hemoglobina y de plaquetas (111-114). Pava *et al.* (2016) encontraron que el riesgo de anemia es mayor en aquellos con parasitemias asintomáticas (OR= 2,9; IC 95% 2,1-4,0) y submicroscópicas (OR= 2,5; IC 95% 1,7-3,6) por *P. falciparum* (90).

Se ha descrito activación endotelial leve e inflamación crónica en niños con infecciones asintomáticas. La inflamación crónica puede a su vez, relacionarse con la anemia, pero las consecuencias a largo plazo de la inflamación y activación endotelial crónica como resultado de la infección por *Plasmodium* spp. no han sido exploradas, se sugiere que podrían contribuir al desarrollo de eventos adversos a largo plazo, como enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis y disfunción endotelial. Las alteraciones a nivel hematológico e inflamatorio, llevan a suponer que la presencia de parásitos por si sola tiene consecuencias para la salud (111, 115). Por otra parte, la cronicidad de las infecciones submicroscópicas puede alterar la función de los neutrófilos favoreciendo la presencia de enfermedades bacterianas invasivas que pueden eventualmente producir la muerte (80).

Los estudios mencionados previamente son transversales lo cual limita las conclusiones que se pueden tener. Katrak *et al.* (2018) siguieron una cohorte de niños y adultos en Uganda para evaluar las consecuencias clínicas de las infecciones submicroscópicas y encontraron que estas infecciones están asociadas con el desarrollo de fiebre en niños en los grupos de edad de 2 a 5 y 5 a 10 años (aRR 1,42; IC 95% 1,03-1,98 y aRR 2,01; IC 95% 1,49-2,71 respectivamente) y con signos y síntomas diferentes a la fiebre (auto-reporte de dolor abdominal, anorexia, vómitos, diarrea, tos, dolor de cabeza, dolor en las articulaciones, dolor muscular, convulsiones, o ictericia en la visita de rutina) en niños de 5 a 10 años (aRR 1,44; IC 95%= 1,17-1,78) (101) (110).

En resumen, las infecciones por *Plasmodium* spp. a cualquier densidad parasitaria pueden exacerbar otras enfermedades de importancia clínica principalmente en niños, por lo que reducir su prevalencia ayudaría a reducir la morbilidad y mortalidad por otras causas.

## 2.12. Referencias

1. Ta TH, Hisam S, Lanza M, Jiram AI, Ismail N, Rubio JM. First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*. *Malar J*. 2014;13(1):68.
2. Okoko BJ, Enwere G, Ota MO. The epidemiology and consequences of maternal malaria: a review of immunological basis. *Acta Trop*. 2003;87(2):193-205.
3. Kitchen AD, Chiodini PL, Tossell J. Detection of malarial DNA in blood donors--evidence of persistent infection. *Vox Sang*. 2014;107(2):123-31.
4. Guerra CA, Howes RE, Patil AP, Gething PW, Van Boeckel TP, Temperley WH, et al. The international limits and population at risk of *Plasmodium vivax* transmission in 2009. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(8):e774.
5. Pradhan V, Ghosh K. Immunological disturbances associated with malarial infection. *J Parasit Dis*. 2013;37(1):11-5.
6. Bottius E, Guanzirolli A, Trape JF, Rogier C, Konate L, Druilhe P. Malaria: even more chronic in nature than previously thought; evidence for subpatent parasitaemia detectable by the polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1996;90(1):15-9.
7. Galatas B, Bassat Q, Mayor A. Malaria Parasites in the Asymptomatic: Looking for the Hay in the Haystack. *Trends Parasitol*. 2015.
8. World Health Organization. (2018). World malaria report 2018. World Health Organization. <http://www.who.int/iris/handle/10665/275867>. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
9. Instituto Nacional de Salud. (2018). Informe de Evento Malaria, Colombia, 2018. Instituto Nacional de Salud: FOR-R02.4000-001; [Available from: [https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/MALARIA\\_2018.pdf](https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/MALARIA_2018.pdf)].
10. Instituto Departamental de Salud de Nariño. Informe ENOS por Municipio y Departamento, años 2008 a 2017 [Available from: <http://www.idsn.gov.co/index.php/subdireccion-de-salud-publica/epidemiologia/429-eventos-de-notificacion-enos>].

11. INS. Informes de Evento 2004-2019, Instituto Nacional de Salud [Available from: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Paginas/Info-Evento.aspx>].
12. White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM. Malaria. *Lancet*. 2014;383(9918):723-35.
13. Spencer L, Gómez G, Collovini E. Mecanismos de invasión del esporozoito y merozoito de Plasmodium. *Bionatura*. 2016;1(2):89-94.
14. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature*. 2002;415(6872):673-9.
15. Deroost K, Pham TT, Opdenakker G, Van den Steen PE. The immunological balance between host and parasite in malaria. *FEMS Microbiol Rev*. 2016;40(2):208-57.
16. Langhorne J, Ndungu FM, Sponaas AM, Marsh K. Immunity to malaria: more questions than answers. *Nat Immunol*. 2008;9(7):725-32.
17. Riley EM, Wahl S, Perkins DJ, Schofield L. Regulating immunity to malaria. *Parasite Immunol*. 2006;28(1-2):35-49.
18. WHO. Severe malaria. *Trop Med Int Health*. 2014;19 Suppl 1:7-131.
19. Doolan DL, Dobaño C, Baird JK. Acquired immunity to malaria. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(1):13-36, Table of Contents.
20. Marsh K, Kinyanjui S. Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunol*. 2006;28(1-2):51-60.
21. Leoratti FM, Durlacher RR, Lacerda MV, Alecrim MG, Ferreira AW, Sanchez MC, et al. Pattern of humoral immune response to Plasmodium falciparum blood stages in individuals presenting different clinical expressions of malaria. *Malar J*. 2008;7:186.
22. COHEN S, MCGREGOR IA, CARRINGTON S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature*. 1961;192:733-7.
23. Fowkes FJ, Richards JS, Simpson JA, Beeson JG. The relationship between anti-merozoite antibodies and incidence of Plasmodium falciparum malaria: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Med*. 2010;7(1):e1000218.
24. John CC, Moormann AM, Pregibon DC, Sumba PO, McHugh MM, Narum DL, et al. Correlation of high levels of antibodies to multiple

pre-erythrocytic *Plasmodium falciparum* antigens and protection from infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73(1):222-8.

25. Richards JS, Stanisic DI, Fowkes FJ, Tavul L, Dabod E, Thompson JK, et al. Association between naturally acquired antibodies to erythrocyte-binding antigens of *Plasmodium falciparum* and protection from malaria and high-density parasitemia. *Clin Infect Dis.* 2010;51(8):e50-60.

26. Osier FH, Fegan G, Polley SD, Murungi L, Verra F, Tetteh KK, et al. Breadth and magnitude of antibody responses to multiple *Plasmodium falciparum* merozoite antigens are associated with protection from clinical malaria. *Infect Immun.* 2008;76(5):2240-8.

27. Bull PC, Marsh K. The role of antibodies to *Plasmodium falciparum*-infected-erythrocyte surface antigens in naturally acquired immunity to malaria. *Trends Microbiol.* 2002;10(2):55-8.

28. Villasis E, Lopez-Perez M, Torres K, Gamboa D, Neyra V, Bendezu J, et al. Anti-*Plasmodium falciparum* invasion ligand antibodies in a low malaria transmission region, Loreto, Peru. *Malar J.* 2012;11:361.

29. Vigan-Womas I, Lokossou A, Guillotte M, Juillerat A, Bentley G, Garcia A, et al. The humoral response to *Plasmodium falciparum* VarO rosetting variant and its association with protection against malaria in Beninese children. *Malar J.* 2010;9:267.

30. Andrade BB, Rocha BC, Reis-Filho A, Camargo LM, Tadei WP, Moreira LA, et al. Anti-*Anopheles darlingi* saliva antibodies as marker of *Plasmodium vivax* infection and clinical immunity in the Brazilian Amazon. *Malar J.* 2009;8:121.

31. Baum E, Sattabongkot J, Sirichaisinthop J, Kiattibutr K, Davies DH, Jain A, et al. Submicroscopic and asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections are common in western Thailand - molecular and serological evidence. *Malar J.* 2015;14:95.

32. Shekalaghe S, Alifrangis M, Mwanziva C, Enevold A, Mwakalinga S, Mkali H, et al. Low density parasitaemia, red blood cell polymorphisms and *Plasmodium falciparum* specific immune responses in a low endemic area in northern Tanzania. *BMC Infect Dis.* 2009;9:69.

33. Proietti C, Verra F, Bretscher MT, Stone W, Kanoi BN, Balikagala B, et al. Influence of infection on malaria-specific antibody dynamics in a cohort exposed to intense malaria transmission in northern Uganda. *Parasite Immunol.* 2013;35(5-6):164-73.

34. Gomes LR, Totino PR, Sanchez MC, Daniel EP, Macedo CS, Fortes F, et al. Asymptomatic infection in individuals from the municipality of Barcelos (Brazilian Amazon) is not associated with the anti-Plasmodium falciparum glycosylphosphatidylinositol antibody response. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;108(6):796-800.
35. Gavina K, Gnidehou S, Arango E, Hamel-Martineau C, Mitran C, Agudelo O, et al. Clinical Outcomes of Submicroscopic Infections and Correlates of Protection of VAR2CSA Antibodies in a Longitudinal Study of Pregnant Women in Colombia. *Infect Immun*. 2018;86(4).
36. Kinyanjui SM, Conway DJ, Lanar DE, Marsh K. IgG antibody responses to Plasmodium falciparum merozoite antigens in Kenyan children have a short half-life. *Malar J*. 2007;6:82.
37. Cavanagh DR, Elhassan IM, Roper C, Robinson VJ, Giha H, Holder AA, et al. A longitudinal study of type-specific antibody responses to Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 in an area of unstable malaria in Sudan. *J Immunol*. 1998;161(1):347-59.
38. Fowkes FJ, Boeuf P, Beeson JG. Immunity to malaria in an era of declining malaria transmission. *Parasitology*. 2016;143(2):139-53.
39. Weiss GE, Traore B, Kayentao K, Ongoiba A, Doumbo S, Doumtable D, et al. The Plasmodium falciparum-specific human memory B cell compartment expands gradually with repeated malaria infections. *PLoS Pathog*. 2010;6(5):e1000912.
40. Crompton PD, Kayala MA, Traore B, Kayentao K, Ongoiba A, Weiss GE, et al. A prospective analysis of the Ab response to Plasmodium falciparum before and after a malaria season by protein microarray. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(15):6958-63.
41. Akpogheneta OJ, Duah NO, Tetteh KK, Dunyo S, Lanar DE, Pinder M, et al. Duration of naturally acquired antibody responses to blood-stage Plasmodium falciparum is age dependent and antigen specific. *Infect Immun*. 2008;76(4):1748-55.
42. White MT, Griffin JT, Akpogheneta O, Conway DJ, Koram KA, Riley EM, et al. Dynamics of the antibody response to Plasmodium falciparum infection in African children. *J Infect Dis*. 2014;210(7):1115-22.
43. Yman V, White MT, Asghar M, Sundling C, Sondén K, Draper SJ, et al. Antibody responses to merozoite antigens after natural

Plasmodium falciparum infection: kinetics and longevity in absence of re-exposure. BMC Med. 2019;17(1):22.

44. Britton S, Cheng Q, McCarthy JS. Novel molecular diagnostic tools for malaria elimination: a review of options from the point of view of high-throughput and applicability in resource limited settings. Malar J. 2016;15(1):88.

45. Koepfli C, Nguitragool W, Hofmann NE, Robinson LJ, Ome-Kaius M, Sattabongkot J, et al. Sensitive and accurate quantification of human malaria parasites using droplet digital PCR (ddPCR). Sci Rep. 2016;6:39183.

46. Singh B, Bobogare A, Cox-Singh J, Snounou G, Abdullah MS, Rahman HA. A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. Am J Trop Med Hyg. 1999;60(4):687-92.

47. Echeverry DF, Deason NA, Davidson J, Makuru V, Xiao H, Niedbalski J, et al. Human malaria diagnosis using a single-step direct-PCR based on the Plasmodium cytochrome oxidase III gene. Malar J. 2016;15:128.

48. Britton S, Cheng Q, Grigg MJ, Poole CB, Pasay C, William T, et al. Sensitive Detection of Plasmodium vivax Using a High-Throughput, Colourimetric Loop Mediated Isothermal Amplification (HtLAMP) Platform: A Potential Novel Tool for Malaria Elimination. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(2):e0004443.

49. Hofmann NE, Gruenberg M, Nate E, Ura A, Rodriguez-Rodriguez D, Salib M, et al. Assessment of ultra-sensitive malaria diagnosis versus standard molecular diagnostics for malaria elimination: an in-depth molecular community cross-sectional study. Lancet Infect Dis. 2018;18(10):1108-16.

50. Imwong M, Hanchana S, Malleret B, Rénia L, Day NP, Dondorp A, et al. High-throughput ultrasensitive molecular techniques for quantifying low-density malaria parasitemias. J Clin Microbiol. 2014;52(9):3303-9.

51. Bousema T, Okell L, Felger I, Drakeley C. Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. Nat Rev Microbiol. 2014;12(12):833-40.



52. Okell LC, Ghani AC, Lyons E, Drakeley CJ. Submicroscopic infection in Plasmodium falciparum-endemic populations: a systematic review and meta-analysis. *J Infect Dis.* 2009;200(10):1509-17.
53. Moreira CM, Abo-Shehada M, Price RN, Drakeley CJ. A systematic review of sub-microscopic Plasmodium vivax infection. *Malar J.* 2015;14:360.
54. Haanshuus CG, Chandy S, Manoharan A, Vivek R, Mathai D, Xena D, et al. A High Malaria Prevalence Identified by PCR among Patients with Acute Undifferentiated Fever in India. *PLoS One.* 2016;11(7):e0158816.
55. Roth JM, Korevaar DA, Leeflang MM, Mens PF. Molecular malaria diagnostics: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2016;53(2):87-105.
56. Meeting report of the WHO Evidence Review Group on Low-Density Malaria Infections. World Health Organization; 2017.
57. World Health Organization . (2015). Guidelines for the treatment of malaria, 3rd ed. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/162441>.
58. Basu S, Sahi PK. Malaria: An Update. *Indian J Pediatr.* 2017;84(7):521-8.
59. Buck E, Finnigan NA. Malaria. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing  
StatPearls Publishing LLC.; 2020.
60. Antinori S, Napolitano M, Grande R, Passerini S, Ridolfo AL, Galimberti L, et al. Epidemiological and clinical characteristics of imported malaria in adults in Milan, Italy, 2010-2015. *Eur J Intern Med.* 2018;57:e13-e6.
61. Caceres Carrera L, Victoria C, Ramirez JL, Jackman C, Calzada JE, Torres R. Study of the epidemiological behavior of malaria in the Darien Region, Panama. 2015-2017. *PLoS One.* 2019;14(11):e0224508.
62. Smith Gueye C, Sanders KC, Galappaththy GN, Rundi C, Tobgay T, Sovannaroeth S, et al. Active case detection for malaria elimination: a survey among Asia Pacific countries. *Malar J.* 2013;12:358.
63. Lin JT, Saunders DL, Meshnick SR. The role of submicroscopic parasitemia in malaria transmission: what is the evidence? *Trends Parasitol.* 2014;30(4):183-90.

64. Lindblade KA, Steinhardt L, Samuels A, Kachur SP, Slutsker L. The silent threat: asymptomatic parasitemia and malaria transmission. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2013;11(6):623-39.
65. Rodríguez Vásquez C, Barrera Escobar S, Tobón-Castaño A. Low Frequency of Asymptomatic and Submicroscopic Plasmodial Infections in Urabá Region in Colombia. *J Trop Med.* 2018;2018:8506534.
66. Starzengruber P, Fuehrer HP, Ley B, Thriemer K, Swoboda P, Habler VE, et al. High prevalence of asymptomatic malaria in south-eastern Bangladesh. *Malar J.* 2014;13:16.
67. Tadesse FG, Pett H, Baidjoe A, Lanke K, Grignard L, Sutherland C, et al. Submicroscopic carriage of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in a low endemic area in Ethiopia where no parasitaemia was detected by microscopy or rapid diagnostic test. *Malar J.* 2015;14:303.
68. Koumba Lengongo JV, M'Bondoukwé NP, Ndong Ngomo JM, François S, Ndjoi-Mbiguino A, Mbang Nguema OA, et al. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* parasitaemia in human immunodeficiency virus-infected adults living in Gabon (Central Africa)-a pilot study. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2018;112(3):103-8.
69. Tripura R, Peto TJ, Veugen CC, Nguon C, Davoeung C, James N, et al. Submicroscopic *Plasmodium* prevalence in relation to malaria incidence in 20 villages in western Cambodia. *Malar J.* 2017;16(1):56.
70. Baum E, Sattabongkot J, Sirichaisinthop J, Kiattibutr K, Jain A, Taghavian O, et al. Common asymptomatic and submicroscopic malaria infections in Western Thailand revealed in longitudinal molecular and serological studies: a challenge to malaria elimination. *Malar J.* 2016;15:333.
71. Kaura T, Kaur J, Sharma A, Dhiman A, Pangotra M, Upadhyay AK, et al. Prevalence of submicroscopic malaria in low transmission state of Punjab: A potential threat to malaria elimination. *J Vector Borne Dis.* 2019;56(1):78-84.
72. Ferreira MU, Castro MC. Challenges for malaria elimination in Brazil. *Malar J.* 2016;15(1):284.
73. Barbosa S, Gozze AB, Lima NF, Batista CL, Bastos MaS, Nicolete VC, et al. Epidemiology of disappearing *Plasmodium vivax* malaria: a case study in rural Amazonia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(8):e3109.

74. Ladeia-Andrade S, Ferreira MU, de Carvalho ME, Curado I, Coura JR. Age-dependent acquisition of protective immunity to malaria in riverine populations of the Amazon Basin of Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;80(3):452-9.

75. Cucunubá ZM, Guerra Á, Rivera JA, Nicholls RS. Comparison of asymptomatic *Plasmodium* spp. infection in two malaria-endemic Colombian locations. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2013;107(2):129-36.

76. Vásquez-Jiménez JM, Arévalo-Herrera M, Henao-Giraldo J, Molina-Gómez K, Arce-Plata M, Vallejo AF, et al. Consistent prevalence of asymptomatic infections in malaria endemic populations in Colombia over time. *Malar J.* 2016;15(1):70.

77. Vallejo AF, Chaparro PE, Benavides Y, Álvarez Á, Quintero JP, Padilla J, et al. High prevalence of sub-microscopic infections in Colombia. *Malar J.* 2015;14:201.

78. Vasoo S, Pritt BS. Molecular diagnostics and parasitic disease. *Clin Lab Med.* 2013;33(3):461-503.

79. Okell LC, Bousema T, Griffin JT, Ouédraogo AL, Ghani AC, Drakeley CJ. Factors determining the occurrence of submicroscopic malaria infections and their relevance for control. *Nat Commun.* 2012;3:1237.

80. Chen I, Clarke SE, Gosling R, Hamainza B, Killeen G, Magill A, et al. "Asymptomatic" Malaria: A Chronic and Debilitating Infection That Should Be Treated. *PLoS Med.* 2016;13(1):e1001942.

81. Sojo-Milano M. CJ, Pizzo N. Malaria Prevalence and Factors Associated to

Infection. Yaguaraparo Parish, State of Sucre. Venezuela, 2004. *Comunidad y Salud.* 2009;7(1):38-45.

82. Kateera F, Mens PF, Hakizimana E, Ingabire CM, Muragijemariya L, Karinda P, et al. Malaria parasite carriage and risk determinants in a rural population: a malariometric survey in Rwanda. *Malar J.* 2015;14:16.

83. 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):e0137458.

84. Samadoulougou S, Maheu-Giroux M, Kirakoya-Samadoulougou F, De Keukeleire M, Castro MC, Robert A. Multilevel and

geo-statistical modeling of malaria risk in children of Burkina Faso. *Parasit Vectors*. 2014;7:350.

85. Mosha JF, Sturrock HJ, Brown JM, Hashim R, Kibiki G, Chandramohan D, et al. The independent effect of living in malaria hotspots on future malaria infection: an observational study from Misungwi, Tanzania. *Malar J*. 2014;13:445.

86. Woyessa A, Deressa W, Ali A, Lindtjørn B. Malaria risk factors in Butajira area, south-central Ethiopia: a multilevel analysis. *Malar J*. 2013;12:273.

87. Mutsigiri-Murewanhema F, Mafaune PT, Shambira G, Juru T, Bangure D, Mungati M, et al. Factors associated with severe malaria among children below ten years in Mutasa and Nyanga districts, Zimbabwe, 2014-2015. *Pan Afr Med J*. 2017;27:23.

88. Amoako N, Asante KP, Adjei G, Awandare GA, Bimi L, Owusu-Agyei S. Associations between red cell polymorphisms and *Plasmodium falciparum* infection in the middle belt of Ghana. *PLoS One*. 2014;9(12):e112868.

89. Clark TD, Greenhouse B, Njama-Meya D, Nzarubara B, Maiteki-Sebuguzi C, Staedke SG, et al. Factors determining the heterogeneity of malaria incidence in children in Kampala, Uganda. *J Infect Dis*. 2008;198(3):393-400.

90. Pava Z, Burdam FH, Handayuni I, Trianty L, Utami RA, Tirta YK, et al. Submicroscopic and Asymptomatic *Plasmodium Parasitaemia* Associated with Significant Risk of Anaemia in Papua, Indonesia. *PLoS One*. 2016;11(10):e0165340.

91. Drakeley C, Gonçalves B, Okell L, Slater H. Understanding the Importance of Asymptomatic and Low-Density Infections for Malaria Elimination. In: IntechOpen, editor. *Towards Malaria Elimination - A Leap Forward* 2018. p. 129-47.

92. Ashley EA, White NJ. The duration of *Plasmodium falciparum* infections. *Malar J*. 2014;13:500.

93. Tripura R, Peto TJ, Chalk J, Lee SJ, Sirithiranont P, Nguon C, et al. Persistent *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections in a western Cambodian population: implications for prevention, treatment and elimination strategies. *Malar J*. 2016;15(1):181.

94. Szmitko PE, Kohn ML, Simor AE. Plasmodium falciparum malaria occurring 8 years after leaving an endemic area. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009;63(1):105-7.
95. Felger I, Maire M, Bretscher MT, Falk N, Tiaden A, Sama W, et al. The dynamics of natural Plasmodium falciparum infections. *PLoS One.* 2012;7(9):e45542.
96. Camargo EP, Alves F, Pereira da Silva LH. Symptomless Plasmodium vivax infections in native Amazonians. *Lancet.* 1999;353(9162):1415-6.
97. Nguyen TN, von Seidlein L, Nguyen TV, Truong PN, Hung SD, Pham HT, et al. The persistence and oscillations of submicroscopic Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax infections over time in Vietnam: an open cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(5):565-72.
98. Slater HC, Ross A, Felger I, Hofmann NE, Robinson L, Cook J, et al. The temporal dynamics and infectiousness of subpatent Plasmodium falciparum infections in relation to parasite density. *Nat Commun.* 2019;10(1):1433.
99. Bousema JT, Gouagna LC, Drakeley CJ, Meutstege AM, Okech BA, Akim IN, et al. Plasmodium falciparum gametocyte carriage in asymptomatic children in western Kenya. *Malar J.* 2004;3:18.
100. Arango E, Alvarez T, Carmona J, Blair S. [Gametocyte levels in response to differing malaria treatments in two municipalities of Colombia]. *Biomedica.* 2004;24(1):79-88.
101. McKenzie FE, Jeffery GM, Collins WE. Gametocytemia and fever in human malaria infections. *J Parasitol.* 2007;93(3):627-33.
102. 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.
103. Price R, Nosten F, Simpson JA, Luxemburger C, Phaipun L, ter Kuile F, et al. Risk factors for gametocyte carriage in uncomplicated falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;60(6):1019-23.
104. Sowunmi A, Okuboyejo TM, Gbotosho GO, Happi CT. Risk factors for gametocyte carriage in uncomplicated falciparum malaria in children before and after artemisinin-based combination treatments. *Chemotherapy.* 2011;57(6):497-504.
105. Group WGS. Gametocyte carriage in uncomplicated Plasmodium falciparum malaria following treatment with artemisinin

combination therapy: a systematic review and meta-analysis of individual patient data. *BMC Med.* 2016;14:79.

106. Schneider P, Bousema JT, Gouagna LC, Otieno S, van de Vegte-Bolmer M, Omar SA, et al. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* gametocyte densities frequently result in mosquito infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;76(3):470-4.

107. Alves FP, Gil LH, Marrelli MT, Ribolla PE, Camargo EP, Da Silva LH. Asymptomatic carriers of *Plasmodium* spp. as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon. *J Med Entomol.* 2005;42(5):777-9.

108. Vallejo AF, García J, Amado-Garavito AB, Arévalo-Herrera M, Herrera S. *Plasmodium vivax* gametocyte infectivity in sub-microscopic infections. *Malar J.* 2016;15(1):48.

109. Rosanas-Urgell A, Kattenberg JH. Are ultra-sensitive molecular tools needed to detect malaria transmitters? *Lancet Infect Dis.* 2018;18(10):1052-4.

110. Katrak S, Nayebare P, Rek J, Arinaitwe E, Nankabirwa JI, Kanya M, et al. Clinical consequences of submicroscopic malaria parasitaemia in Uganda. *Malar J.* 2018;17(1):67.

111. de Mast Q, Brouwers J, Syafruddin D, Bousema T, Baidjoe AY, de Groot PG, et al. Is asymptomatic malaria really asymptomatic? Hematological, vascular and inflammatory effects of asymptomatic malaria parasitemia. *J Infect.* 2015;71(5):587-96.

112. Gudo ES, Prista A, Jani IV. Impact of asymptomatic *Plasmodium falciparum* parasitemia on the immunohematological indices among school children and adolescents in a rural area highly endemic for malaria in southern Mozambique. *BMC Infect Dis.* 2013;13:244.

113. Maketa V, Mavoko HM, da Luz RI, Zanga J, Lubiba J, Kalonji A, et al. The relationship between *Plasmodium* infection, anaemia and nutritional status in asymptomatic children aged under five years living in stable transmission zones in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *Malar J.* 2015;14:83.

114. Maina RN, Walsh D, Gaddy C, Hongo G, Waitumbi J, Otieno L, et al. Impact of *Plasmodium falciparum* infection on haematological parameters in children living in Western Kenya. *Malar J.* 2010;9 Suppl 3:S4.

115. Park GS, Ireland KF, Opoka RO, John CC. Evidence of Endothelial Activation in Asymptomatic Plasmodium falciparum Parasitemia and Effect of Blood Group on Levels of von Willebrand Factor in Malaria. J Pediatric Infect Dis Soc. 2012;1(1):16-25.

### Capítulo 3

## 3. Infecciones microscópicas y submicroscópicas por *Plasmodium* spp. en la costa Pacífica Colombiana: estudio epidemiológico e inmunológico

### 3.1. Introducción

Pese al esfuerzo sostenido por parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para cumplir con los objetivos de la eliminación de la malaria propuestos en la Estrategia Técnica Mundial 2016-2030 (1), en los últimos tres años no se han logrado avances significativos en la disminución del número de casos de malaria, advirtiéndose un estancamiento en el progreso (2). De acuerdo con la OMS, en el año 2017 se reportaron 219 millones de casos, con un incremento promedio de 3033 casos anuales con respecto a lo reportado entre el 2014 al 2016 (2).

Uno de los principales retos para lograr el éxito de los programas de control de la malaria es el diagnóstico y tratamiento oportuno, no solo de las infecciones sintomáticas sino también de las asintomáticas. En zonas de baja a moderada transmisión como en Colombia, las infecciones asintomáticas cursan con bajas parasitemias y en su mayoría son submicroscópicas (infecciones de baja densidad), es decir, que no son detectadas por la microscopía, considerada la prueba estándar para el diagnóstico de la malaria (3, 4). Estas infecciones representan un desafío para los programas de control, dado que en ausencia de síntomas, las personas no acuden a los puestos de diagnóstico y no son tratadas, por lo tanto son consideradas reservorios silentes de la infección. Se ha demostrado que estas infecciones contribuyen a la transmisión y con ello impiden el alcance de los objetivos del control y eliminación de la malaria (3, 5).

Las infecciones asintomáticas y submicroscópicas por *Plasmodium* spp. son el resultado de la combinación de una serie de factores que contribuyen a un estado de tolerancia a los parásitos (6). Si bien estos factores no se conocen muy bien, es claro que la respuesta inmune juega un papel clave en el desarrollo de estas infecciones (6, 7). Individuos que viven en zonas endémicas desarrollan no solo una inmunidad anti-enfermedad en la que el individuo puede portar parásitos sin desarrollar síntomas, sino también una inmunidad anti-parasitaria que limita la



cantidad de parásitos y es el producto del tiempo de exposición y los antecedentes previos de la enfermedad (8-10).

Adicional a los factores inmunológicos, otros factores se han asociado a este tipo de infecciones, sin embargo son pocos los reportes y los resultados no son concluyentes. Cucunubá *et al.* (2013) identificaron que ser hombre y tener más de un episodio previo de malaria incrementa la posibilidad de tener infecciones asintomáticas y submicroscópicas (OR=2,5; IC 95% 1,0-6,7 y OR=3,0; IC 95% 1,0-9,4 respectivamente) (11) mientras que Pava *et al.* (2016) indicaron que quienes no usan mosquiteros y tienen más de 5 años de edad tienen un mayor riesgo de tener infección submicroscópicas (12). No obstante, en este último estudio se encontró que ser mujer incrementa la posibilidad de tener este tipo de infecciones (12), discrepando con los hallazgos previos (11).

Además de las diferencias en el diseño de los estudios y las pruebas diagnósticas empleadas para la detección de las infecciones en cada uno de ellos, las características propias de las regiones pueden explicar en parte los resultados contradictorios. Lo anterior resalta la importancia de que, además de identificar los focos de estas infecciones, se debe realizar una caracterización de las zonas de estudio y de la población portadora, y posteriormente, dirigir las estrategias de control según las necesidades de cada región.

Colombia ocupa el cuarto lugar en incidencia de casos de malaria en la región de las Américas (2). Para el 2018 se reportaron 63143 casos de malaria, 54 % de los cuales provenían de la región Pacífica, en donde los departamentos del Chocó (27,7%) y Nariño (21,8 %) fueron los que aportaron el mayor número de casos al país (13). Estas cifras corresponden en su mayoría a casos sintomáticos, por lo que la incidencia de la infección puede ser mayor.

Previos estudios transversales han revelado la presencia de infecciones asintomáticas/submicroscópicas en diferentes regiones de Colombia, oscilando entre un 1,3% a un 15% (11, 14-16). Conviene aclarar que la mayoría de los estudios se refieren a infecciones asintomáticas en los cuales, además de la fiebre, no se descartan la presencia de otros síntomas típicos o atípicos de la infección, por tanto, más que infecciones asintomáticas deberían denominarse infecciones afebriles (14).

Muchos de los estudios realizados en el territorio colombiano, se llevaron a cabo en zonas rurales del país. Sin embargo, aunque se sabe que la malaria se presenta principalmente en estas áreas, un incremento en el número de casos urbanos y peri-urbanos se ha presentado en el país en los últimos años (17, 18), principalmente en la costa Pacífica (19). Por lo anterior, es necesario conocer si en estas áreas urbanas al igual que en las rurales, están presentes las infecciones afebriles/submicroscópicas y cuáles son los factores condicionantes.

Con respecto al posible impacto de estas infecciones en la transmisión, Vallejo *et al.* (2016) reportaron previamente que cerca del 4.2% de individuos asintomáticos infectados con *P. vivax* de la costa Pacífica colombiana son infectivos para *An. albimanus* (20). Si bien en Colombia hay estudios que muestran la problemática de las infecciones asintomáticas y submicroscópicas, se requiere conocer más a profundidad el aporte de estas infecciones en la transmisión de la infección en nuestro contexto y los factores que las condicionan.

La identificación de los reservorios de las infecciones submicroscópicas permitirá conocer las áreas geográficas donde se producen y los posibles factores condicionantes; además, su contribución potencial para perpetuar el ciclo transmisión, información útil para diseñar e implementar medidas efectivas de control en los programas de vigilancia de malaria en el país.

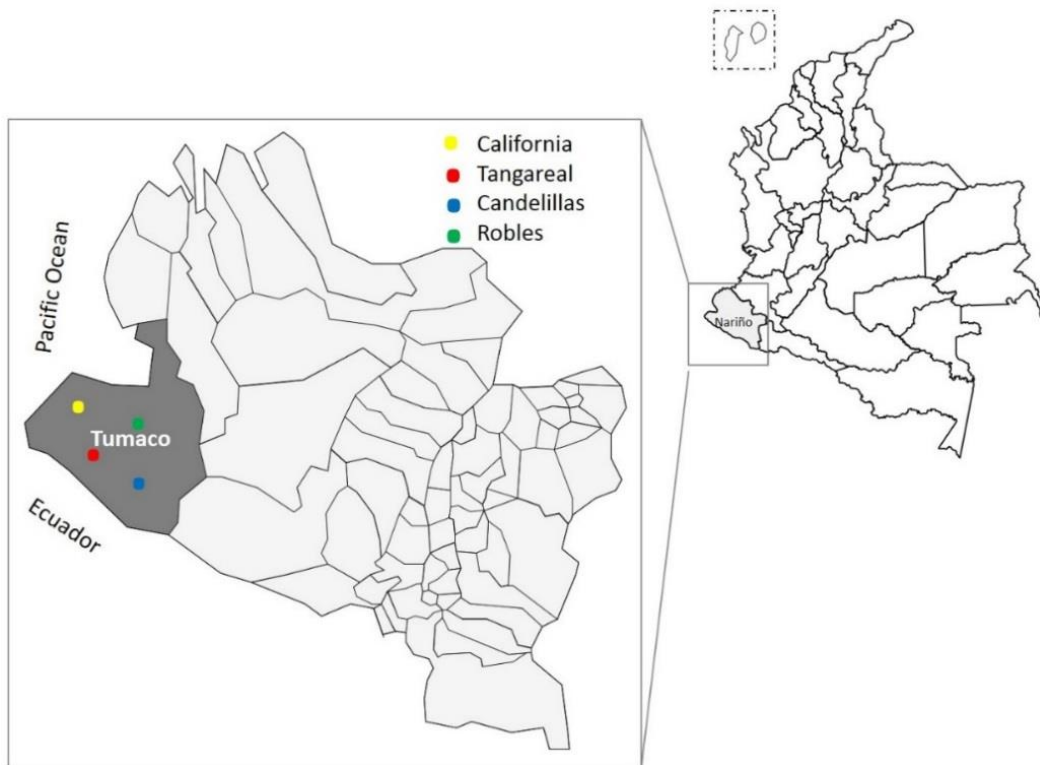
Por lo anterior, el presente trabajo, el cual hace parte de un estudio longitudinal que busca estudiar la dinámica de las infecciones submicroscópicas en el tiempo, tuvo como objetivos, (i) identificar la frecuencia de infecciones microscópicas y submicroscópicas en zonas urbanas y rurales del municipio de Tumaco (costa Pacífica colombiana) y explorar sus factores asociados, (ii) caracterizar la respuesta inmune humoral de las infecciones afebriles y submicroscópicas y (iii) detectar la frecuencia de infecciones submicroscópicas que albergan gametocitos de *Plasmodium* spp. como un estimador indirecto del impacto de estas infecciones en la transmisión.

## 3.2. Métodos

**3.2.1. Diseño del estudio.** Se diseñó un estudio descriptivo transversal en cuatro localidades del municipio de Tumaco (Nariño) en Colombia, entre agosto del 2017 y marzo de 2018.

**3.2.2. Sitios de estudio.** Tumaco es un municipio localizado en el sur de Colombia (1 850'N, 78845'W) (Figura C3.1) y es el segundo municipio más importante de la Costa Pacífica colombiana. Tiene un área de 3760 Km<sup>2</sup> y se encuentra a dos metros sobre el nivel del mar, con una temperatura promedio de 28°C y está clasificada como bosque tropical muy húmedo con una de las precipitaciones más altas del mundo (hasta 1200 mm por año) (11). Cerca del 44% de sus habitantes viven en el área rural. El municipio de Tumaco se encuentra dividido en cinco zonas, las cuales tienen dificultades para su integración por la ausencia de infraestructura para la conectividad y el transporte. Las principales actividades económicas son la agricultura, la ganadería, la minería, la pesca, la madera, el comercio y la actividad del puerto (21). Para el año 2017, En Tumaco se reportó una incidencia 13,5 casos de malaria por cada 1000 habitantes en el municipio (22); *An. albimanus* es reconocido como el principal vector en la zona y *P. falciparum* es la especie predominante (96%) (11).

Cuatro localidades dentro de Tumaco fueron seleccionadas con base en los reportes históricos de malaria, la distancia desde el casco urbano y la facilidad del personal de campo de llegar a estos sitios. El primer sitio fue el barrio California, localizado en el área urbana de Tumaco, no hay datos sobre el tamaño de la población ya que este lugar es considerado, en su mayoría, un barrio en invasión. El segundo sitio fue Tangareal, a 30 minutos en motocicleta del casco urbano; este sitio es reconocido como un área peri-urbana pues presenta tanto características rurales como urbanas y tiene una población aproximada de 611 personas. Por último, Candelillas y Robles, las cuales son veredas en el área rural a 40 y 60 minutos de distancia en carro desde el casco urbano respectivamente. Candelillas tiene una población de 964 personas y Robles de 972 (Figura C3.1).



**Figura C3.1.** Localización de los sitios de estudio en el Municipio de Tumaco, Nariño, Colombia.

Mapa modificado de:  
[http://moe.org.co/home/doc/comunicados/mapa\\_colombia\\_MOE\\_vector.es.pptx](http://moe.org.co/home/doc/comunicados/mapa_colombia_MOE_vector.es.pptx) Mapa político en vectores de Colombia – Departamentos y Municipios MOE

**3.2.3. Población de estudio y muestreo.** Dado que la fase transversal está enmarcada en un estudio observacional longitudinal, el tamaño de la muestra fue calculado para dar respuesta a la pregunta de la fase longitudinal (Capítulo 4).

El cálculo del tamaño de la muestra arrojó que se debían identificar en la fase transversal al menos 67 individuos con infección submicroscópica. Para ello, se seleccionaron cuatro localidades con apoyo del personal de programa de ETV (enfermedades transmitidas por vectores) del municipio de Tumaco.

El muestreo en cada localidad fue no probabilístico por conveniencia. Se seleccionó una porción geográfica a muestrear en cada sitio con la ayuda del personal de ETV quienes delimitaron las zonas en las que se podía muestrear basados en la mayor incidencia de casos en dichas áreas y en

la seguridad del personal de campo para la inclusión de participantes. En estos sectores delimitados, todas las personas que cumplieran con los criterios de inclusión se invitaron a participar. Si durante la primera visita a una vivienda no se encontraban todos los miembros de la familia, se realizaron hasta dos visitas adicionales tratando de incluir al máximo todas las personas que habitaran las áreas delimitadas inicialmente.

#### Datos sociodemográficos y clínicos

Todas las personas que cumplieron con los criterios de elegibilidad fueron invitadas a participar del estudio y quienes aceptaron, posterior a la firma de consentimiento (Anexo C3.1) y/o asentimiento informado (Anexo C3.2), fueron encuestados para obtener información sobre sus datos sociodemográficos, ocupación, antecedentes de malaria, medidas de prevención de la malaria y presencia de signos y síntomas clínicos (Anexo C3.3). Adicionalmente, por cada vivienda visitada que incluyera al menos un participante, un formulario con las características de la vivienda fue diligenciado (Anexo C3.4).

Posteriormente, se tomó la temperatura axilar a cada participante, y se estableció fiebre cuando la temperatura axilar fue  $>37,5^{\circ}\text{C}$  (23, 24). Una muestra de 5mL de sangre venosa preservada en heparina fue tomada para hacer el diagnóstico microscópico, el diagnóstico molecular de *Plasmodium* spp., detección de gametocitos, medición de los niveles de hemoglobina y evaluación de los niveles de anticuerpos. Las muestras se preservaron a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta ser procesadas en la unidad de control de vectores del municipio de Tumaco.

Participantes que al ingreso al estudio tuvieron una gota gruesa positiva, además de fiebre y síntomas de malaria, recibieron tratamiento antimalárico inmediato según las guías nacionales (25). Por su parte, aquellos con gota gruesa o prueba LAMP positiva y temperatura axilar  $\leq 37,5^{\circ}\text{C}$  fueron seguidos hasta por dos semanas (considerando un periodo de incubación de 15 días dado que la especie predominante en el área es *P. falciparum*) para valorar la proporción de infecciones que se encontraban en periodo de incubación al ingreso al estudio. Quienes presentaron gota gruesa positiva, fiebre y síntomas agudos de la infección durante este seguimiento, recibieron tratamiento inmediato. Todos los procedimientos de laboratorio están consignados en el manual de procedimientos del proyecto (Anexo C3.5).

### **3.2.4. Procedimientos de laboratorio**

**3.2.4.1. Diagnóstico microscópico.** Se realizaron dos gotas gruesas por participante. Debido a la presencia de anticoagulante en las muestras, las láminas se secaron al aire durante 24 horas y posteriormente fueron fijadas con calor a 37°C por un minuto previo a la coloración de Giemsa. Las gotas gruesas fueron leídas con base en las guías nacionales (26). La parasitemia fue estimada en un total de 200 leucocitos (asumiendo un valor promedio de 8000 leucocitos/uL de sangre) y el resultado se reportó como el número de parásitos por uL de sangre. Una segunda lectura de las láminas fue realizada por un microscopista experto y los resultados discordantes se resolvieron con un tercer lector. Como no hubo resultados discordantes entre el segundo y tercer lector, el reporte final corresponde al segundo lector quien hizo lectura de todas las láminas del estudio.

**3.2.4.2. Diagnóstico molecular.** El diagnóstico molecular de la infección por *Plasmodium* spp. se realizó en campo empleando la técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP). Se usaron los kit comerciales Loopamp Malaria-Pan y malaria-Pf (Eiken Chemical Co., Tokyo, Japon) para la detección de género *Plasmodium* y *P. falciparum* respectivamente, siguiendo los procedimientos de operación e instrucciones del fabricante (27).

Para la extracción del ADN, se empleó el método de calentamiento y centrifugación, brevemente, 60µL de sangre preservada en heparina se mezclaron con 60µL de buffer de extracción (100mM Tris HCl, pH 6,4, SDS 10%, NaCl 5M, agua grado molecular). Se hizo una incubación por 5 minutos a 95°C y posteriormente la mezcla fue centrifugada a 10000g por 3 minutos, finalmente 30µL del sobrenadante (ADN extraído) fueron diluidos en 345µL de agua estéril.

Para el paso de amplificación, los reactivos que vienen liofilizados en los tubos de reacción de la PCR fueron resuspendidos en 30µL del ADN diluido y posteriormente incubados 65°C por 40 minutos y a 80°C por otros 5 minutos para detener la reacción. Un control positivo y uno negativo fueron corridos en cada ensayo de LAMP y la lectura de los resultados se hizo de manera visual empleando una lámpara de luz UV basado en la fluorescencia de los controles. Todas las pruebas de LAMP fueron realizadas en campo por un microscopista entrenado en la técnica. Todas las muestras fueron procesadas para LAMP-Pan y solo las positivas fueron posteriormente evaluadas con LAMP-Pf.

**3.2.4.3. Medición de los niveles de Inmunoglobulinas.** La determinación de los niveles de anticuerpos inmunoglobulinas G y M (IgG e IgM) se hizo mediante un ensayo de ELISA a partir de sangre seca en papel de filtro Whatman 903 para detectar anticuerpos contra las proteínas recombinantes: Pf-MSP1 (30-AP 79, Fitzgerald), Pf-AMA1 (30-1388, Fitzgerald), Pv-MSP1 (30-AP78, Fitzgerald) y el péptido Pv-121 (28).

La medición de los niveles de anticuerpos se hizo en todos los individuos con infección submicroscópica, 15 con infección microscópica y en una sub-muestra de 50 individuos no infectados, seleccionados de forma aleatoria. Adicionalmente 36 muestras de sangre seca en papel de filtro Whatman 903 de ciudadanos norteamericanos que refieren nunca haber salido del país en toda la vida y por ende nunca han estado expuestos al parásito se usaron como controles para establecer los puntos de corte de la seropositividad en los niveles de IgG (media +3DE) (Sup C3.1).

La mitad de un papel de filtro fue eluído en buffer de elución (PBS 1X, Tween 20 0.05%) y se incubó toda la noche a 4°C. Posteriormente, una dilución 1:50 del eluído fue usada en las ELISAs. Los platos Nunc-Maxisorp de 96 pozos (Nalgene Nunc International, Rochester, NY) fueron sensibilizados con 50µL/pozo de cada uno de los antígenos a una concentración de 1µg/mL en PBS 1X. Los platos fueron incubados toda la noche a 4°C y posteriormente bloqueados con 200µL de buffer de bloqueo (5% de leche en polvo, PBS 1X y tween 20 al 0.05%) durante 1,5 horas a 37°C. Las muestras fueron diluidas en una relación 1:50 en buffer de bloqueo y evaluadas por duplicado (50uL por pozo). Los platos se incubaron con las muestras durante 1,5 horas a 37°C, posteriormente se hicieron tres lavados con buffer de lavado (PBS 1X y tween 20 al 0,1%) y se incubaron con 50µL/pozo con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (AbCam, Cambridge, MA). Después de tres lavados, la reacción enzimática se desarrolló empleando TMB como sustrato (Tetrametilbenzidina, AbCam). La reacción se detuvo con 50uL/pozo de ácido sulfúrico 0,25 N y las densidades ópticas (DO) se midieron a 450nm en un espectrofotómetro Eon Biotek (Biotek Instruments, Inc, Winooski, VT).

Cada plato evaluado contenía por duplicado un control positivo (pool de muestras de suero de habitantes de Nariño con reporte de más de un episodio previo de malaria), un control negativo (pool de muestras

individuos nunca antes expuestos a *Plasmodium* spp.) y un blanco que contenía todos los reactivos del ELISA excepto muestra.

Se hizo un proceso de normalización de las Densidades ópticas (DO) de los niveles de anticuerpos para controlar la variación entre los platos sensibilizados con un mismo antígeno (29). En resumen, los niveles de anticuerpos fueron expresados como el  $\Delta DO$  que es la DO de la media de las réplicas de cada muestra menos la media de la DO del blanco. Posteriormente, para cada péptido, los controles positivos de cada plato son promediados y este es dividido con el  $\Delta DO$  del control positivo de cada plato, obteniendo de esta manera el factor de normalización de cada plato. Finalmente, el factor es multiplicado con el  $\Delta DO$  de cada una de las muestras y con ello se obtiene un  $\Delta DO$  normalizado para los análisis estadísticos.

**3.2.4.4.** Detección de gametocitos. Los gametocitos maduros en las muestras submicroscópicas fueron identificados mediante la amplificación de transcriptos del ARNm. El ARN fue extraído a partir muestras de sangre conservadas en papel de filtro 903 (50uL de sangre). La extracción del ARN se hizo con el kit Quick-RNA™ Miniprep (Zymo Research) y adicionalmente se empleó DNase I (Zymo Research) para degradar selectivamente el ADN contaminante en la muestra. La mitad de un círculo de papel de filtro fue incubada con 600uL de buffer de lisis en agitación a 1000 rpm durante 2 horas. Posterior a este paso, todas las indicaciones del fabricante fueron seguidas. Una vez realizada la extracción, se hizo la cuantificación del ARN en las muestras y se realizó la síntesis del ADNc empleando el kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen).

Para la detección de los gametocitos de *P. falciparum*, se hizo una PCR en tiempo real para amplificar los genes Pfs25 y Pfs230 (macro-gametocitos y micro-gametocitos respectivamente) usando los cebadores propuestos por Santolamazza *et al.* (2017) (30) y para la detección de gametocitos de *P. vivax* se emplearon los cebadores propuestos por Bharti *et al.* (2006) para amplificar el gen Pvs25 de gametocitos hembra (31). Todas las muestras fueron corridas por triplicado usando el termociclador QuantStudio3 (Applied Biosystems). El volumen final de reacción fue de 10uL/pozo que contenía 2uL del ADNc, 5uL del master mix PowerUp™ SYBR™ Green (ThermoFisher) y 0,7uM de cada cebador. La amplificación incluyó un paso de activación de la UDG a 50°C (2 minutos) seguido de otro paso de activación de la polimerasa Dual-Lock™ a 95°C (2 minutos)



previos a los 40 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95°C por 15 segundos, alineamiento de 15 segundos a 60° y extensión a 72°C por 1 minuto). Adicionalmente se hizo la curva de disociación a 95°C por 15 segundos, seguido de 1 minuto a 60°C y 15 segundos a 95°C. Una muestra fue considerada como positiva si al menos uno de los pozos tenía un valor de CT  $\leq 37$  y si además la curva de disociación correspondía con la curva del control positivo.

La detección molecular de los gametocitos no se realizó en las infecciones microscópicas.

### **3.2.5. Definiciones**

**3.2.5.1. Infección submicroscópica.** Infecciones por *Plasmodium* spp. detectadas por LAMP pero no por microscopía.

**3.2.5.2. Infección afebril.** Participantes con temperatura axilar  $\leq 37,5^{\circ}\text{C}$  y con infección por *Plasmodium* spp. independiente de la prueba diagnóstica

**3.2.6. Análisis estadístico.** Todos los datos consignados en los formularios de cada participante, (incluyendo los resultados de las pruebas de laboratorio) y de cada vivienda fueron registrados en una base de datos en Microsoft Access ® y el análisis estadístico se realizó en Stata/MP versión 14.0 (32) y en Prism versión 5.0 (33).

Se realizó un control de calidad de la digitación de los datos comparando un 10% de los registros de la base de datos con los formularios físicos. Dado que porcentaje de errores en la digitación en Microsoft Access ® fue menor del 5%, se hicieron las correcciones debidas y no se realizó re-digitación de los datos.

Las prevalencias de infección fueron calculadas con sus respectivos intervalos de confianza del 95% en la población general y discriminadas según la positividad de LAMP y microscopía. Se describió cada uno de los grupos de infección (no infectadas, microscópicas y submicroscópicas) según sexo, edad, fiebre, anemia y las variables relacionadas con los antecedentes de malaria. Para la exploración de los factores asociados a la infección, se usó un modelo de ecuaciones estimables generalizadas (GEE, por sus siglas en inglés) (34) que tuvo en cuenta la estructura anidada de los datos (958 personas anidadas en 360 viviendas). El GEE

se modeló con una distribución de Poisson con enlace logarítmico y una matriz de correlación intercambiable. Para cada factor estudiado, se calculó la razón de prevalencia (RP) de estar infectado, de manera cruda y ajustada por ocupación y edad con sus respectivos intervalos de confianza del 95%. Se evaluó el supuesto de linealidad de la edad y número de episodios (variables cuantitativas) con el riesgo de infección usando regresión no paramétrica.

Para el análisis de los anticuerpos, se calcularon las medianas con sus respectivos rangos intercuartiles (RI) para los  $\Delta$ DO normalizados de cada anticuerpo por grupos de infección. La prueba de Kruskal Wallis se realizó para comparar los niveles de anticuerpos entre estos grupos y la prueba *posthoc* de Dunn se realizó para hacer comparaciones múltiples por parejas. Se calculó la proporción de portadores de gametocitos con su respectivo intervalo de confianza del 95% y la razón macro-gametocito (hembra)/micro-gametocito (macho) de las infecciones submicroscópicas.

**3.2.7. Consideraciones éticas.** Este estudio fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia (Acta 014 del 09 de agosto de 2017) (Anexo C3.6). La firma del consentimiento y/o asentimiento informado de todos los participantes se obtuvo antes de la obtención de la muestra y de la recolección de los datos.

### 3.3. Resultados

**3.3.1. Prevalencia de infecciones por *Plasmodium* spp. y factores asociados.** Un total de 958 individuos fueron ingresados al estudio; 30,3% vivían en el área urbana, 24,1% en el área periurbana y 45,6% residían en el área rural del Tumaco; 62,4% fueron mujeres y la mediana de la edad fue de 25 años (RI= 11-41años). 9,3% (89/958) de los participantes estaban infectadas con *Plasmodium* spp. (IC 95% 7,6 - 11,3) detectados por alguna de las dos técnicas, de estos, dos de ellos presentaron fiebre y los síntomas clásicos de malaria al ingreso al estudio.

La mayoría de las infecciones (74%, n=66/89) fueron diagnosticadas con *P. falciparum*, las muestras restantes se clasificaron como *Plasmodium* spp. De las muestras afebriles y positivas por microscopia (n=21), la mediana de la parasitemia fue de 112 parásitos/uL (RI=32-386 parásitos/uL). El 74,1% de las infecciones (66/89) fueron solamente

detectadas por LAMP. En el área urbana y peri-urbana se presentaron las prevalencias más altas de infección en comparación con el área rural, siendo el barrio California el lugar con mayor prevalencia de infecciones submicroscópicas (10,0%; IC 95%=7,0-14,0%) y Tangareal, el lugar con la mayor prevalencia de infecciones microscópicas afebriles (5,6%; IC 95%=3,3 -9,5%) (Tabla C3.1).

Durante el seguimiento de dos semanas, 3/87 participantes (3,4%) fueron catalogados como en periodo de incubación ya que desarrollaron malaria; uno de ellos tenía infección microscópica afebril al ingreso y presentó fiebre al día 8 acompañado de un incremento en la parasitemia con respecto al día del ingreso y los otros dos, clasificados inicialmente con infección submicroscópica afebril, presentaron fiebre en la segunda semana de seguimiento (segunda semana) acompañada de una parasitemia microscópica.

Al comparar las características entre infectados y no infectados al ingreso al estudio, se observa que los infectados presentaron una proporción de anemia más alta que los no infectados. La mayoría de las infecciones se presentaron en personas mayores de 15 años, a su vez, las personas infectadas presentaron una mayor proporción de antecedentes de malaria en toda la vida y en el último año en comparación con las no infectadas (Tabla C3.2).

**Tabla C3.1.** Prevalencia total y por prueba diagnóstica de las infecciones por *Plasmodium* spp. en la población de estudio

Municipio	Total			Infecciones microscópicas*			Infecciones sub-microscópicas†		
	n	%	IC 95%	n	%	IC 95%	n	%	IC 95%
TOTAL n=958	89	9,3	7,6 - 11,3	23	2,4	1,6 - 3,6	66	6,9	5,4 - 8,7
<i>Plasmodium</i> spp.	23	2,4	1,6 - 3,6	0	-	NA - 0,0	23	2,4	1,6 - 94,6
<i>P. falciparum</i>	66	6,9	5,4 - 8,7	23	2,4	1,6 - 3,6	43	4,5	3,3 - 6,0
<b>Localidad</b>									
California n=290	37	12,8	9,4 - 17,1	8	2,8	1,4 - 5,4	29	10,0	7,0 - 14,0
Tangareal n=231	35	15,2	11,1 - 20,4	13	5,6	3,3 - 9,5	22	9,5	6,3 - 14,1
Robles n=232	11	4,7	2,6 - 8,4	2	0,9	0,2 - 3,4	9	3,9	2,0 - 7,3
Candelillas n=205	6	2,9	1,3 - 6,4	0	-	NA	6	2,9	1,3 - 6,4

\* *Gota gruesa positiva y LAMP positiva*

† *Gota gruesa negativa y LAMP positiva*

**Tabla C3.2.** Características clínicas, sociodemográficas y de antecedentes de malaria en la población de estudio según infección por *Plasmodium* spp.

Característica	No infectadas	Infecciones microscópicas*	Infecciones sub-microscópicas†	Total
	n= 869	n= 23	n= 66	n=958
Temperatura axilar(°C); mediana (RI)	36,7 (36,5-36,9)	36,7 (36,4-37,2)	36,8 (36,5-37,3)	36,7 (36,5-37,0)
Hemoglobina, g/dL; mediana(RI)	12,3 (11,6-13,2)	12,8 (11,0-13,3)	12,2 (11,1-13,5)	12,3 (11,5-13,2)
Anemia, hemoglobina <11g/dL; n (%)	122 (14,2)	5 (21,7)	13 (19,7)	140 (14,7)
Sexo masculino; n (%)	319 (36,7)	12 (52,2)	29 (43,9)	360 (37,6)
Edad, año; mediana(RI)	25 (11-41)	28 (12-51)	27 (11-40)	25 (11-41)
<5; n (%)	37 (4,2)	2 (8,7)	4 (6,1)	43 (4,5)
5-15; n (%)	263 (30,3)	6 (26,1)	19 (28,8)	288 (30,1)
> 15; n (%)	569 (65,5)	15 (65,2)	43 (65,1)	627 (65,4)
Afiliación al régimen de salud				
Contributivo; n (%)	101 (11,7)	1 (4,4)	13 (18,6)	115 (12,0)
Subsidiado; n (%)	708 (81,9)	19 (82,6)	54 (77,1)	781 (81,6)
No afiliado; n (%)	55 (6,4)	3 (13,0)	3 (4,3)	61 (6,4)
Ocupación al aire libre; n (%)	487 (59,3)	13 (61,9)	40 (52,5)	540 (59,6)
Malaria en toda la vida; mediana(RI)	1 (0-2)	2 (0-2)	1 (0-2)	1 (0-2)
Ninguno; n (%)	412 (47,8)	7 (30,4)	25 (37,9)	444 (46,7)
1; n (%)	197 (22,9)	2 (8,7)	20 (30,3)	219 (23,0)
>1; n (%)	253 (29,3)	14 (60,9)	21 (31,8)	288 (30,3)
Historia previa de malaria; n (%)	457 (52,6)	16 (69,6)	41 (62,1)	514 (53,7)
Malaria en el último año; n (%)	161 (18,6)	12 (52,2)	17 (25,8)	190 (19,9)

\* *Gota gruesa positiva y LAMP positiva*, † *Gota gruesa negativa y LAMP positiva*

Con respecto a los factores asociados a las infecciones por *Plasmodium* spp., el modelo crudo indicó que padecer malaria en el último año incrementa la posibilidad de tener una infección actual por *Plasmodium* spp. (PR 1,64; IC 95%= 1,02-2,64), al igual que vivir en las áreas más urbanas en comparación con las rurales (PR 4,46; IC 95%= 1,64-12,16 en California y PR 4,98; IC 95%=1,81-13,7 en Tangareal). Esta asociación se conservó en el modelo ajustado por ocupación y edad, dos variables asociadas a la exposición a *Plasmodium* spp. De manera interesante, el modelo ajustado reveló que la edad se asocia con un incremento en la posibilidad de estar infectado y si bien, por grupos etarios no hubo una asociación significativa, debido a que el efecto de la infección es lineal constante en los valores de la edad (Sup C3.2), se puede sugerir que a medida que incrementa la edad, la posibilidad de estar infectado incrementa también (Tabla C3.3).

Para explorar si las variables asociadas a las infecciones afebriles por *Plasmodium* spp. tenían el mismo efecto y dirección que las variables asociadas a las infecciones tanto febriles como afebriles, se corrió un modelo GEE en el que se sustrajeron las dos infecciones maláricas detectadas al ingreso y las tres infecciones que desarrollaron malaria durante las dos semanas de seguimiento, los resultados son similares, en ambos modelos (Sup C3.3).

Se evaluó el mismo modelo incluyendo únicamente las infecciones submicroscópicas, con y sin los dos participantes que desarrollaron malaria en el seguimiento (Sup C3.4 y Sup C3.5 respectivamente). En estos, solo la variable lugar se asoció con las infecciones submicroscópicas sugiriendo que probablemente la edad y haber tenido malaria en el último año se asocian con tener infección por *Plasmodium* independiente de si esta es submicroscópica o no. Tampoco se puede descartar que la ausencia de significancia estadística obedezca a que el número de muestras analizadas se redujo.

**Tabla C3.3.** Características del individuo y la vivienda y su asociación con las infecciones por *Plasmodium spp.*

Característica	Infectados				RP crudo*		RP ajustado†	
	No	Si	RP	IC 95%	RP	IC 95%	RP	IC 95%
<b>Individuo</b>								
<b>Sexo</b> n (%)								
Mujer	550	92,0	48	8,0	1 <sup>‡</sup>		1	
Hombre	319	88,6	41	11,4	1,41	0,93 - 2,13	1,53	0,89 - 2,62
<b>Lugar de ocupación,</b> n (%)								
Interior	334	91,3	32	8,7	1		1	
Exterior	487	90,2	53	9,8	1,18	0,76 - 1,84	1,42	0,88 - 2,29
<b>Edad, años;</b> mediana(RI)	25,0	(11-41)	27,0	(11-42)	1,01	0,99 - 1,02	<b>1,01</b>	<b>1,00 - 1,02</b>
<6; n (%)	63	88,7	8	11,3	1		1	
6-15; n (%)	237	91,2	23	8,9	0,83	0,36 - 1,92	0,65	0,25 - 1,67
16-25; n (%)	142	92,2	12	7,8	0,69	0,27 - 1,74	0,72	0,26 - 2,01
> 25; n (%)	427	90,3	46	9,7	1,02	0,47 - 2,24	1,10	0,44 - 2,77
<b>Malaria previa,</b> n (%)								
No	412	92,8	32	7,2	1		1	
Si	457	88,9	57	11,1	1,46	0,94 - 2,27	1,40	0,87 - 2,26
<b>Episodios malaria, episodios;</b> mediana (RI)	1	(0-2)	1	(0-2)	1,08	0,98 - 1,19	1,06	0,95 - 1,18
0 n (%)	412	92,8	32	7,2	1		1	
1 n (%)	197	89,0	22	10,1	1,39	0,81 - 2,39	1,33	0,75 - 2,35
>1 n (%)	253	87,9	35	12,2	1,57	0,95 - 2,58	1,52	0,88 - 2,63
<b>Malaria el último año;</b> n (%)								
No	704	92,1	60	7,9	1		1	
Si	161	84,7	29	15,3	<b>1,64</b>	<b>1,02 - 2,64</b>	<b>1,70</b>	<b>1,05 - 2,76</b>

**Continuación tabla C3.3.**

Característica	Infectados				RP crudo*			RP ajustado†		
	No		Si		RP	IC 95%		RP	IC 95%	
<b>Vivienda</b>										
<b>Lugar; n (%)</b>										
Candelillas	199	97,1	6	2,9	1			1		
Robles	221	95,3	11	4,7	1,60	0,50	- 5,17	1,39	0,43	- 4,51
Tangareal	196	84,8	35	15,2	<b>4,98</b>	<b>1,81</b>	- <b>13,70</b>	<b>4,66</b>	<b>1,70</b>	- <b>12,77</b>
California	253	87,2	37	12,8	<b>4,46</b>	<b>1,64</b>	- <b>12,16</b>	<b>3,95</b>	<b>1,45</b>	- <b>10,79</b>
<b>Habitantes por vivienda; n (%)</b>										
1 - 4	390	91,1	38	8,9	1			1		
≥5	469	90,2	51	9,8	1,07	0,65	- 1,76	1,22	0,73	- 2,04
<b>Animales en la vivienda; n (%)</b>										
No	278	91,7	25	8,3	1			1		
Si	580	90,2	63	9,8	1,30	0,73	- 2,31	1,29	0,72	- 2,31
<b>Servicio de electricidad, n (%)</b>										
Si	841	90,7	86	9,3	1			1		
No	5	83,3	1	16,7	1,64	0,17	- 15,85	1,65	0,17	- 15,97
<b>Servicio de acueducto, n (%)</b>										
Si	407	92,3	34	7,7	1			1		
No	444	89,3	53	10,7	1,33	0,80	- 2,22	1,3	0,75	- 2,12

\*Razón de prevalencia, †Ajustado por ocupación y edad, ‡Categoría de referencia



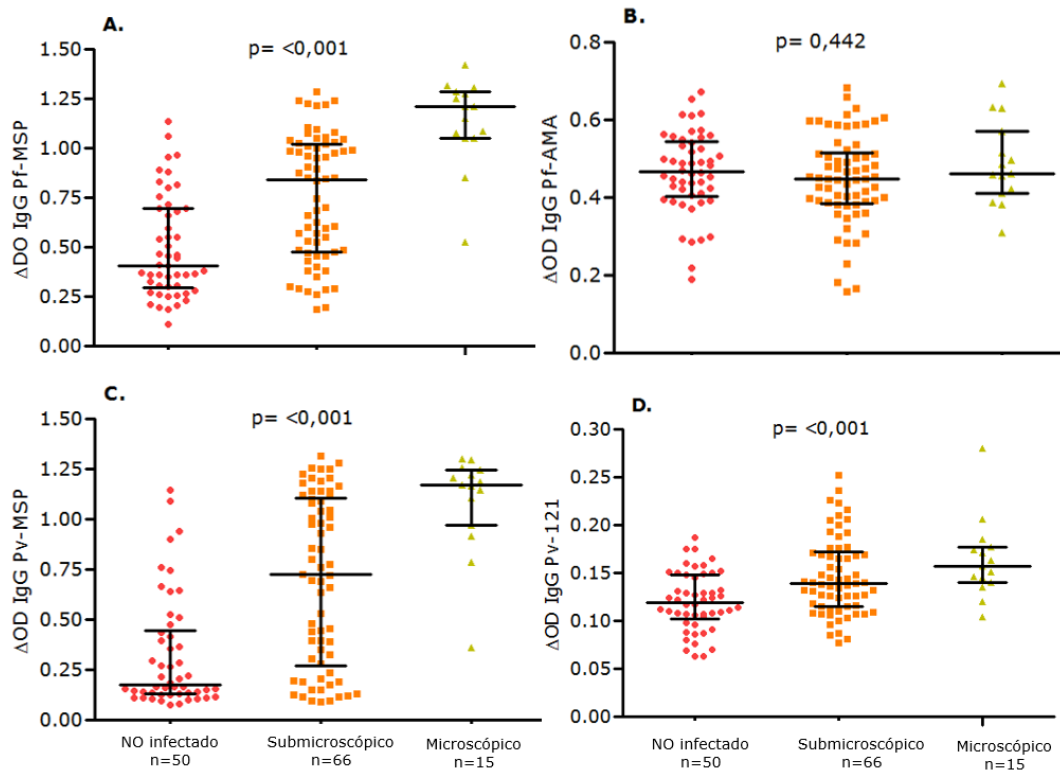
**3.3.2. Niveles de anticuerpos en las infecciones por *Plasmodium* spp.** El 90,8% de los participantes a quienes se les midieron los niveles de anticuerpos (119/131) fueron seropositivos para anticuerpos IgG anti Pf-MSP1 y sólo 3 de 66 muestras con infección submicroscópica fueron negativas para Pf-MSP1. No obstante, ningún participante fue seropositivo a Pf-AMA1. Por su parte, la seroprevalencia frente a *P. vivax* fue más baja, 101 (77,1%) participantes fueron seropositivos para Pv-MSP1 y 80 (61,2%) para Pv-121 (

### 3.3.3. Sup C3.6).

La mediana de los niveles de IgG anti Pf-MSP1 fue más alta en quienes reportaron haber tenido malaria previa (0,881; RI=0,486- 1,061) que en quienes no (0,456; RI= 0,301-0,800) ( $p < 0,001$ ). Este mismo comportamiento se evidenció con IgG anti Pv-MSP1 pero no con Pf-AMA1 y Pv-121.

Con respecto a los niveles de anticuerpos, se observó que en los individuos con infección microscópica (en los que la densidad de parásitos es mayor) hay mayores niveles de anticuerpos en comparación con los individuos con infección submicroscópica y no infectados. Los niveles de IgG anti Pf-MSP1 más bajos se presentaron en los individuos sin infección (mediana 0,4085, RI=0,301-0,696) seguido por los que presentan infecciones submicroscópicas (mediana 0,8405; RI= 0,478-1,02), mientras que los participantes con infecciones microscópicas mostraron los mayores niveles (mediana 1,209; RI=1,053- 1,285). Este mismo comportamiento se observó con los niveles de IgG anti Pv-MSP1 y Pv-121, pero no en Pf-AMA1 (Figura C3.2). El mismo comportamiento fue observado en la subpoblación de individuos diagnosticados con *P. falciparum* (Sup C3.7).

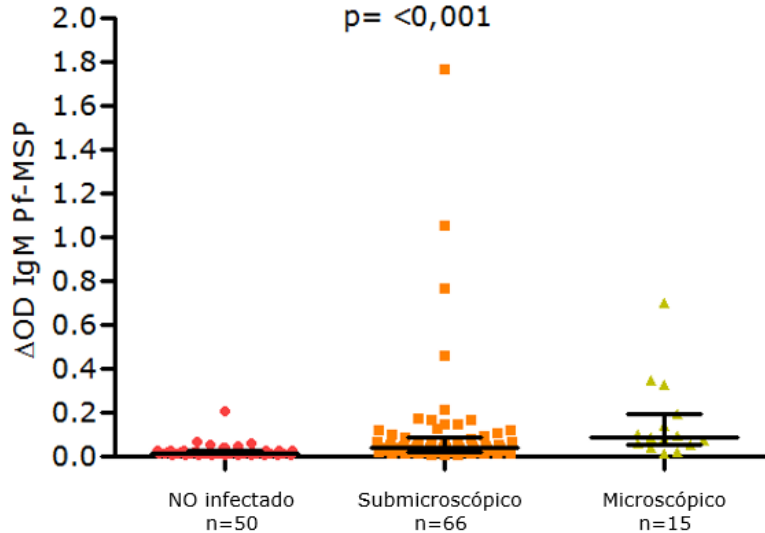
Con relación a la edad, se encontró una correlación positiva con los niveles de anticuerpos IgG anti Pv-MSP1 y anti Pv-121 en el total de la muestra pero no con Pf-AMA1 y Pf-MSP1 (Sup C3.8). En la sub-muestra de las infecciones por *P. falciparum* no hubo correlación con la edad y los niveles de anticuerpos (Sup C3.9).



**Figura C3.2** Niveles de IgG contra Pf-MSP1 (A), Pf-AMA1 (B), Pv-MSP1 (C) y Pv-121 (D) por grupo de infección.

La línea horizontal localizada en el medio de la línea vertical representa la mediana del  $\Delta$ DO; las líneas horizontales a los extremos, representan el cuartil inferior y superior. Cada círculo rosado representa un participante no infectado, los cuadros naranja a cada participante con infección microscópica y los triángulos verdes participantes con infección submicroscópica. El valor de  $p$  en cada recuadro corresponde al obtenido por la prueba de Kruskal-Wallis.

Resultados similares se observaron con IgM anti Pf-MSP1, no obstante, los niveles de estos anticuerpos fueron menores en comparación con IgG anti Pf-MSP1 (mediana 0,018; RI= 0,013-0,025 en no infectadas, 0,043; RI= 0,025- 0,089 en submicroscópicos y 0,087; RI= 0,054- 0,193 en microscópicas) (Figura C3.3). En las comparaciones por parejas, las diferencias en los niveles de IgM anti Pf-MSP1 se presentaron solamente entre las infectadas y no infectadas, mientras que los niveles de IgG anti Pf-MSP1 difirieron tanto entre infectadas y no infectadas como en microscópicas y submicroscópicas.

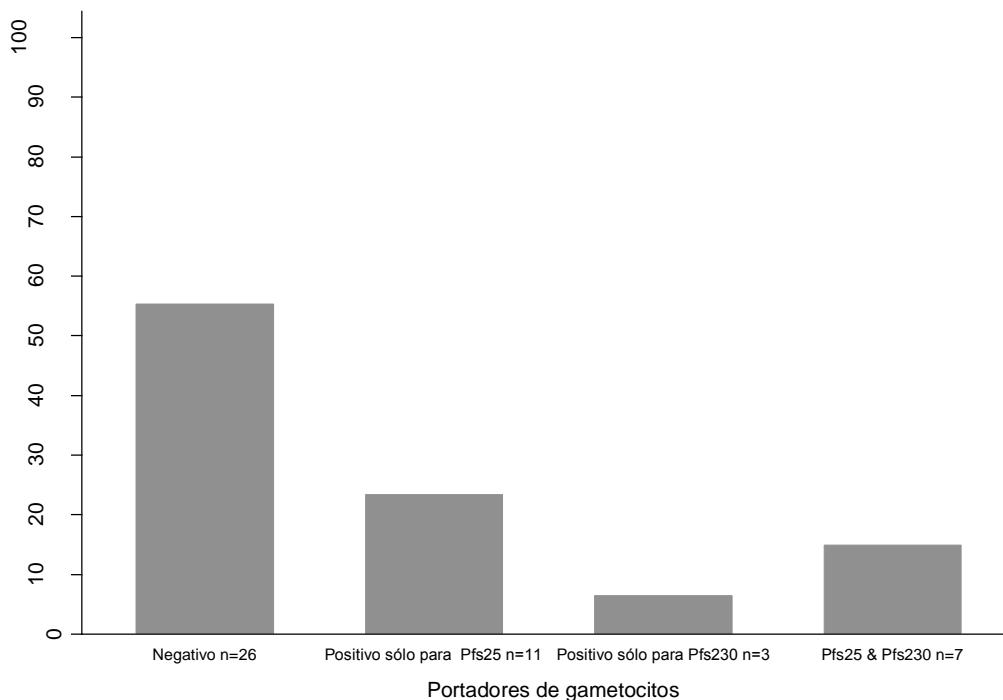


**Figura C3.3** Niveles de IgM contra Pf-MSP1 por grupo de infección. La línea horizontal localizada en el medio de la línea vertical representa la mediana del  $\Delta$ DO; las líneas horizontales a los extremos, representan el cuartil inferior y superior. Cada círculo rosado representa un participante no infectado, los cuadros naranja a cada participante con infección microscópica y los triángulos verdes participantes con infección submicroscópica. El valor de  $p$  corresponde al obtenido por la prueba de Kruskal-Wallis

**3.3.4. Proporción de portadores de gametocitos.** La presencia de gametocitos en las infecciones microscópicas se estudió por microscopia, encontrándose una proporción de portadores de gametocitos del 76,2% (IC 95% 0,52-0,91), con una mediana de gametocitemia de 80 gametocitos/uL (RI=32-68 gametocitos/uL).

Por su parte, la proporción de portadores de gametocitos en los individuos con infección submicroscópicas se evaluó por RT-PCR en 47 de las 66 muestras, de acuerdo con la disponibilidad de papel filtro 903 para la extracción del ARN. De estos, 26 fueron negativos tanto para los macro como micro-gametocitos y 21 (44,7%; IC 95%=30,7%-59,5%) fueron positivos para al menos alguno de los dos tipos de gametocitos de *P. falciparum*. La gran mayoría de las muestras positivas tenían gametocitos hembra (18/21) y sólo 10 tenían gametocitos macho, solos (n=3) o en combinación con los gametocitos hembra (n=7) (Figura C3.4). Por cada muestra positiva para gametocitos macho, se encontraron 2 positivas para gametocitos hembra de *P. falciparum* (relación 1,8). Hubo 4

muestras que fueron positivas para gametocitos de *P. falciparum* que solo habían sido identificadas por LAMP como *Plasmodium* spp. Ninguna muestra fue positiva para gametocitos de *P. vivax*



**Figura C3.4** Portadores de gametocitos en infecciones submicroscópicas

### 3.4. Discusión

En el presente trabajo se evidenció la alta frecuencia de infecciones submicroscópicas y afebriles en zonas urbanas y periurbanas del municipio de Tumaco, la mayoría de las cuales portaron gametocitos, sugiriendo la presencia de reservorios con potencial impacto en el mantenimiento de la transmisión de malaria.

En este estudio, la prevalencia de infección por *Plasmodium* spp. detectada por LAMP fue de 9,3%. El 97,7% fueron afebriles y 74,1% submicroscópicas; las prevalencias más altas se encontraron en las áreas urbanas y periurbanas de Tumaco. En Colombia, diferentes estudios han evaluado la prevalencia de infecciones submicroscópicas y asintomáticas en la costa Pacífica y otras regiones. Cucunubá *et. al* (2013) reportaron entre el 2006-2007 una prevalencia de infecciones asintomáticas por nPCR en Tumaco del 5,8%; 83,3% de las cuales fueron submicroscópicas

(11). Por su parte, en una serie de estudios transversales realizados entre el 2011 al 2014 en diferentes regiones de Colombia se reportaron prevalencias de infección detectada por qPCR entre el 4% (IC 95: 3–5 %) al 10% (IC 95%= 8–12%), donde el 97% de estas infecciones fueron submicroscópicas (15). Adicionalmente, un estudio realizado en 10 sitios con perfiles epidemiológicos diferentes, incluida la costa Pacífica, señaló una prevalencia de infecciones por *Plasmodium* spp. del 7,24% por RT-PCR, el 98% de estas infecciones fueron a su vez detectadas por la prueba LAMP realizada en campo (35). Finalmente, en dos localidades de la costa Pacífica Caucana se reportó una prevalencia del 1% (13/1368) y del 0,6% (8/1368) de infección asintomática microscópica y submicroscópica producidas por *P. falciparum* (36).

Si bien, los estudios mencionados arriba emplearon diferentes pruebas moleculares para la detección de las infecciones submicroscópicas y las localidades variaron entre los estudios, la prevalencia reportada en este trabajo es similar a la reportada previamente en estudios hechos en la Costa Pacífica Colombiana. Adicionalmente, indica que la prueba LAMP, que ha mostrado ser una alternativa con alta sensibilidad para detectar infecciones de bajas densidades parasitarias en otras regiones en el mundo (37-39), puede ser empleada en campo para el diagnóstico de infecciones de baja densidad en Colombia; previos estudios en nuestro país han indicado que la sensibilidad de LAMP con respecto a otras pruebas moleculares es cercana al 100% (35, 40) y por su fácil y rápida ejecución, podría ser implementada en los programas de vigilancia y control de la malaria (41, 42).

Con respecto a estudios similares conducidos en otras áreas endémicas, una revisión reciente sobre la frecuencia de las infecciones por *P. falciparum* en 22 zonas endémicas con diferentes escenarios de transmisión a lo largo del mundo, reveló que ésta varía entre 0,4% a 90,6% y que estas infecciones son más frecuentes en áreas de baja endemia (43).

Se ha sugerido que la inmunidad es el factor que determina más fuertemente la relación entre la infección por *Plasmodium* spp. y el desarrollo de síntomas; esta inmunidad está determinada a su vez por el historial de exposición previa al parásito y la edad (44).

Nuestros resultados indican que la edad parece estar jugando un papel importante en estas infecciones sugiriendo que a medida que incrementa

la edad, hay mayor inmunidad como consecuencia de una mayor exposición (45).

En relación a la historia de malaria, previos resultados han indicado que tener más de dos (11) o tres episodios (46) previos de malaria se asocian con las infecciones de baja densidad. Si bien en el presente estudio no se encontró asociación con tener un episodio previo de malaria en cualquier momento de la vida, se evidenció que tener un episodio de malaria reciente (durante el último año) incrementa 1.6 veces la posibilidad de estar infectado en comparación con quienes no tuvieron malaria reciente, lo cual indica que estas personas han estado previamente expuestas al parásito.

En relación a los datos serológicos, los cuales podrían brindar una información más precisa sobre la exposición al parásito, este trabajo encontró que las infecciones actuales podrían estimular de manera diferencial la producción de anticuerpos dado que los individuos infectados presentan mayores niveles de anticuerpos que los no infectados. Estos hallazgos están en consonancia con los antecedentes previos de malaria reportados por los participantes donde la mediana de los niveles de IgG anti Pf-MSP1 y anti Pv-MSP1 fue más alta en quienes han tenido malaria previa.

Con respecto a IgM anti Pf-MSP1, sus niveles fueron mucho más bajos en comparación con su contraparte IgG indicando que estos podrían ser producto de una infección crónica y que la exposición previa al parásito es importante para controlar los síntomas y las parasitemias. Esto último se puede afirmar también porque los niveles de IgG fueron más altos en las infecciones microscópicas que en las submicroscópicas, mientras que con IgM solo hubo diferencias entre infectados y no infectados pero no entre infecciones microscópicas y submicroscópicas. No obstante, el mayor nivel de IgG en comparación con IgM si bien puede ser el reflejo de exposición previa al parásito, no necesariamente lo es de protección. Un estudio realizado en una zona urbana y una zona rural de la Región Pacífica caucana, demostró la exposición previa de la población a la infección malárica con niveles de serorreactividad a *P. falciparum* de 56,0% y a *P. vivax* de 6,2%, en este estudio se logró determinar que existe exposición previa a la infección malárica en dos contextos ecológicos diferentes de transmisión donde a su vez se presentan reservorios de infecciones submicroscópicas y microscópicas (36), similar a lo encontrado en el presente trabajo.

Una publicación de Baum *et al.* (2015) indicó que de 1000 antígenos analizados por micro-arreglos, 6 de ellos mostraron una respuesta significativamente mayor en las infecciones asintomáticas en comparación con la sintomáticas. En dicho estudio, la proteína MSP2 mostró la mayor capacidad de distinguir aquellos individuos con infecciones sintomáticas y asintomáticas (47). Hallazgos similares con estos antígenos habían sido reportados previamente (48, 49). Si bien, en este trabajo no se hizo una relación con la sintomatología, las proteínas MSP tanto de *P. falciparum* como de *P. vivax* fueron las que mejor discriminaron los grupos de comparación (no infectados, infecciones microscópicas y submicroscópicas). Similares resultados se reportaron en una población en Tanzania donde los individuos no infectados presentaron niveles más bajos de anticuerpos anti MSP-1 ( $p = 0,042$ ) y MSP-2 ( $p = 0,034$ ) pero no de AMA1 ( $p = 0,140$ ) (50).

Por otra parte, en Tailandia se reportaron hallazgos similares indicando que los niveles de anticuerpos en los portadores asintomáticos son mayores que en los no infectadas (51). Adicionalmente, en este mismo estudio se reportó que los niveles de anticuerpos en los portadores asintomáticos son más bajos que su contraparte sintomática, no obstante, después de los 51 años de edad, esta relación se invierte (51), sugiriendo que se requieren una prolongada exposición al parásito a lo largo de la vida para alcanzar protección a las manifestaciones de la enfermedad (52, 53). En el presente estudio además de encontrar una correlación positiva con IgG Pv-MSP1 y Pv-121 y la edad, el modelo GEE señaló una tendencia al incremento de la posibilidad de tener infecciones asintomáticas y submicroscópicas en las personas de mayor edad.

Por otra parte, es interesante resaltar que a pesar de la mayor prevalencia de *P. falciparum* en el área de estudio, los anticuerpos contra Pv-MSP1 y Pv-121 hayan presentado diferencias entre los grupos de infección, (la misma tendencia se observó cuando solo se analizaron las muestras confirmadas como *P. falciparum*). Lo anterior puede ser explicado por una posible reacción cruzada entre epítopes de las dos especies (47, 54) que pueden ser producto de anticuerpos previamente producidos por una infección pasada o de una reactivación de los hipnozoítos de infecciones previas de *P. vivax* (42). Resultados similares fueron reportados en la costa Pacífica Caucana en donde se evidenció respuesta tanto de anticuerpos contra *P. falciparum* como a *P. vivax* en individuos con infección con *P. falciparum*, sugiriendo también la posibilidad de una reacción cruzada con los antígenos de *P. vivax* o la posibilidad de la



circulación de esta especie en esta región dónde la principal especie circulante es *P. falciparum* (36).

Con respecto a la proporción de gametocitos en las infecciones microscópicas asintomáticas, 17 de 21 tenían gametocitos detectables al microscopio y no se puede descartar que los cuatro restantes hayan tenido gametocitemias submicroscópicas. Por su parte, la proporción de infecciones submicroscópicas con gametocitos fue más baja que en las infecciones microscópicas (44,7%). Estos hallazgos están en correspondencia con lo reportado en una revisión sistemática en la que encontraron que la prevalencia de gametocitos detectada por PCR fue significativamente mayor en los individuos con infecciones microscopía/PDR positivos que por PCR. La misma propensión se observó cuando se evaluó su capacidad de infectar mosquitos (43). No obstante, dicho estudio concluyó que, como las parasitemias de las infecciones submicroscópicas pueden alcanzar parasitemias detectables por microscopía/PDR, su detección es importante no solo para prevenir futuros periodos de altas parasitemias sino también para la identificación de focos de infección los cuales están asociados a una mayor exposición y transmisión (43).

En estudios en Latino América, no incluidos en la revisión mencionada anteriormente se reportan diferentes tasas de infectividad para los mosquitos *Anopheles* provenientes de parásitos aislados de portadores con infección submicroscópica y asintomática (1,2-4,2%) (20, 55). Pese a la variabilidad reportada en los porcentajes de infectividad en todos los estudios, es importante considerar que las infecciones submicroscópicas además de ser frecuentes en zonas endémicas, pueden permanecer por mucho tiempo sin ser detectadas por las técnicas diagnósticas de rutina, por ende no son tratadas y en consecuencia su presencia puede tener un impacto importante en la transmisión de la infección.

Por último, debido a que se requiere el apareamiento de dos gametos del sexo opuesto para que los mosquitos sean infectivos (30), el presente estudio abordó de una manera cualitativa la razón de gametos hembra/macho, que en infecciones naturales se ha reportado estar alrededor de 3 a 4 gametos hembra por cada macho. En este trabajo se identificó una relación de 2 en infecciones submicroscópicas, apoyando la hipótesis que las infecciones bien sean sintomáticas o no, microscópicas o submicroscópicas, involucran gametocitos circulantes que pueden infectar

mosquitos aun a bajas parasitemias y que por lo tanto, todas ellas tienen el potencial de contribuir a la transmisión del parásito (56).

Este es el primer estudio en Colombia que aborda de una manera integral las infecciones submicroscópicas, demostrando que existe una respuesta de anticuerpos diferencial entre los grupos de infección que podrían ser útiles para delimitar áreas endémicas según su grado de exposición y que además, estas infecciones pueden contribuir a la transmisión de la infección en la región. No obstante, una de las limitaciones de este estudio fue el no tener un grupo de infecciones sintomáticas para comparar los niveles de anticuerpos y establecer si la presencia de síntomas en las infecciones por *Plasmodium* spp. genera una respuesta diferencial de anticuerpos. Por otra parte, si bien la especie predominante en la zona es *P. falciparum*, conocer la especie en las infecciones que solo dieron positivas por LAMP-pan, permitiría hacer un análisis de anticuerpos según la especie. No obstante, las 4 muestras que fueron positivas para gametocitos de *P. falciparum* que solo habían sido identificadas por LAMP como *Plasmodium* spp., sugiere que la prevalencia de *P. falciparum* puede ser más alta.

### **3.5. Conclusión**

El diagnóstico microscópico subestima considerablemente la prevalencia real de la infección por *Plasmodium* spp. En este estudio la prueba LAMP detectó cerca de 3 veces más la cantidad de infecciones que la microscopía. La mayoría de las infecciones detectadas fueron a su vez afebriles y submicroscópicas, las cuales se relacionaron con episodios previos de malaria y mayores niveles de IgG. Una gran proporción de infecciones submicroscópicas presentan gametocitemias indicando que estas infecciones tienen el potencial de ser reservorios de la infección.

La detección de las infecciones asintomáticas y submicroscópicas debe ser parte de los programas de vigilancia de la salud pública contra la malaria no solo en Colombia sino en regiones de baja transmisión donde la proporción de estas infecciones es alta. La identificación de focos de infección permitirá orientar a los programas de control hacia dónde dirigir los esfuerzos para el control de la enfermedad.

### **3.6. Referencias**

1. OMS. Estrategia Técnica Mundial contra la malaria 2016-2030. Programa Mundial sobre Paludismo Ginebra: Organización Mundial

de la Salud; 2105 [Available from: [http://www.who.int/malaria/areas/global\\_technical\\_strategy/es/](http://www.who.int/malaria/areas/global_technical_strategy/es/)].

2. World Health Organization. (2018). World malaria report 2018. World Health Organization. <http://www.who.int/iris/handle/10665/275867>. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

3. Okell LC, Ghani AC, Lyons E, Drakeley CJ. Submicroscopic infection in Plasmodium falciparum-endemic populations: a systematic review and meta-analysis. *J Infect Dis*. 2009;200(10):1509-17.

4. WHO. World Health Organization. WHO Evidence Review Group on Malaria Diagnosis in Low Transmission settings. Malaria Policy Advisory Committee Meeting 12-14 March 2014, WHO HQ, Geneva: WHO; 2013 [Available from: [http://www.who.int/malaria/mpac/mpac\\_mar2014\\_diagnosis\\_low\\_transmission\\_settings\\_report.pdf](http://www.who.int/malaria/mpac/mpac_mar2014_diagnosis_low_transmission_settings_report.pdf)].

5. Cohen JM, Moonen B, Snow RW, Smith DL. How absolute is zero? An evaluation of historical and current definitions of malaria elimination. *Malar J*. 2010;9:213.

6. Galatas B, Bassat Q, Mayor A. Malaria Parasites in the Asymptomatic: Looking for the Hay in the Haystack. *Trends Parasitol*. 2015.

7. Le Port A, Cot M, Etard JF, Gaye O, Migot-Nabias F, Garcia A. Relation between Plasmodium falciparum asymptomatic infection and malaria attacks in a cohort of Senegalese children. *Malar J*. 2008;7:193.

8. Day KP, Marsh K. Naturally acquired immunity to Plasmodium falciparum. *Immunol Today*. 1991;12(3):A68-71.

9. Daubersies P, Sallenave-Sales S, Magne S, Trape JF, Contamin H, Fandeur T, et al. Rapid turnover of Plasmodium falciparum populations in asymptomatic individuals living in a high transmission area. *Am J Trop Med Hyg*. 1996;54(1):18-26.

10. Trape JF, Rogier C, Konate L, Diagne N, Bouganali H, Canque B, et al. The Dielmo project: a longitudinal study of natural malaria infection and the mechanisms of protective immunity in a community living in a holoendemic area of Senegal. *Am J Trop Med Hyg*. 1994;51(2):123-37.

11. Cucunubá ZM, Guerra Á, Rivera JA, Nicholls RS. Comparison of asymptomatic Plasmodium spp. infection in two malaria-endemic Colombian locations. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2013;107(2):129-36.
12. Pava Z, Burdam FH, Handayuni I, Trianty L, Utami RA, Tirta YK, et al. Submicroscopic and Asymptomatic Plasmodium Parasitaemia Associated with Significant Risk of Anaemia in Papua, Indonesia. *PLoS One.* 2016;11(10):e0165340.
13. Instituto Nacional de Salud. (2018). Informe de Evento Malaria, Colombia, 2018. Instituto Nacional de Salud: FOR-R02.4000-001; [Available from: [https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/MALARIA\\_2018.pdf](https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/MALARIA_2018.pdf)].
14. Rodríguez Vásquez C, Barrera Escobar S, Tobón-Castaño A. Low Frequency of Asymptomatic and Submicroscopic Plasmodial Infections in Urabá Region in Colombia. *J Trop Med.* 2018;2018:8506534.
15. Vásquez-Jiménez JM, Arévalo-Herrera M, Henao-Giraldo J, Molina-Gómez K, Arce-Plata M, Vallejo AF, et al. Consistent prevalence of asymptomatic infections in malaria endemic populations in Colombia over time. *Malar J.* 2016;15(1):70.
16. Vallejo AF, Chaparro PE, Benavides Y, Álvarez Á, Quintero JP, Padilla J, et al. High prevalence of sub-microscopic infections in Colombia. *Malar J.* 2015;14:201.
17. Molina Gómez K, Caicedo MA, Gaitán A, Herrera-Varela M, Arce MI, Vallejo AF, et al. Characterizing the malaria rural-to-urban transmission interface: The importance of reactive case detection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(7):e0005780.
18. Chaparro PE, Molina K, Alzate A, Padilla J, Arévalo-Herrera M, Herrera S. Urban malaria transmission in a non-endemic area in the Andean region of Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2017;112(12):797-804.
19. Padilla JC, Chaparro PE, Molina K, Arevalo-Herrera M, Herrera S. Is there malaria transmission in urban settings in Colombia? *Malar J.* 2015;14:453.
20. Vallejo AF, García J, Amado-Garavito AB, Arévalo-Herrera M, Herrera S. Plasmodium vivax gametocyte infectivity in sub-microscopic infections. *Malar J.* 2016;15(1):48.

21. Alcaldía de Tumaco - Nariño. Presentación del municipio de San Andrés de Tumaco. 2016 [Available from: <http://www.tumaco-narino.gov.co/presentacion.shtml>].

22. Instituto Departamental de Salud de Nariño. Informe ENOS por Municipio y Departamento, años 2008 a 2017 [Available from: <http://www.idsn.gov.co/index.php/subdireccion-de-salud-publica/epidemiologia/429-eventos-de-notificacion-enos>].

23. WHO malaria terminology. Geneva: World Health Organization; 2017 (WHO/HTM/GMP/2016.6; <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/malaria-terminology>).

24. Protocolo de vigilancia en salud pública malaria. Instituto Nacional de Salud. Bogotá; 2017. <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Lineamientos/PRO%20Malaria.pdf>.

25. INS. Instituto Nacional de Salud. Guía para la atención clínica integral del paciente con malaria: Ministerio de la Protección Social, República de Colombia, Dirección General de Salud Pública; 2010 [Available from: <http://www.ins.gov.co/temas-de-interes/Documentacin%20Malaria/02%20Clinica%20Malaria.pdf>].

26. Instituto Nacional de Salud (INS). Ministerio de Salud y Protección Social. Manual para el diagnóstico de malaria no complicada en puestos de diagnóstico y tratamiento. Milenio Editores, editor. Social Impresión 2015.

27. The Foundation for Innovative New Diagnostics (FIND). Manual of standard operating procedures for malaria LAMP. Geneva; 2012. <https://www.fnndx.org/wp-content/uploads/2016/04/SOP-LAMP-Malaria-Aug2012.pdf> . Accessed April 2016.

28. Céspedes N, Li Wai Suen CSN, Koepfli C, França CT, Felger I, Nebie I, et al. Natural immune response to Plasmodium vivax alpha-helical coiled coil protein motifs and its association with the risk of P. vivax malaria. PLoS One. 2017;12(6):e0179863.

29. Londono-Renteria B, Drame PM, Weitzel T, Rosas R, Gripping C, Cardenas JC, et al. An. gambiae gSG6-P1 evaluation as a proxy for human-vector contact in the Americas: a pilot study. Parasit Vectors. 2015;8:533.

30. Santolamazza F, Avellino P, Siciliano G, Yao FA, Lombardo F, Ouédraogo JB, et al. Detection of Plasmodium falciparum male and female gametocytes and determination of parasite sex ratio in human endemic

populations by novel, cheap and robust RTqPCR assays. *Malar J.* 2017;16(1):468.

31. Bharti AR, Chuquiyauri 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):610-6.

32. StataCorp. 2014. *Stata Statistical Software: Release 14* . College Station, TX: StataCorp LP

33. GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, [ww.graphpad.com](http://www.graphpad.com).

34. Twisk J. Generalized estimating equations. In: Press CU, editor. *Applied Longitudinal Data Analysis for Epidemiology*. United States of America: Cambridge University Press; 2003.

35. Vallejo AF, Martínez NL, González IJ, Arévalo-Herrera M, Herrera S. Evaluation of the loop mediated isothermal DNA amplification (LAMP) kit for malaria diagnosis in *P. vivax* endemic settings of Colombia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(1):e3453.

36. Knudson R. *La vigilancia de la malaria asintomática y su contribución al programa de eliminación de la malaria en Guapi-Cauca, Colombia*. Bogotá: Universidad Nacional; 2019.

37. Aydin-Schmidt B, Xu W, González IJ, Polley SD, Bell D, Shakely D, et al. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) accurately detects malaria DNA from filter paper blood samples of low density parasitaemias. *PLoS One.* 2014;9(8):e103905.

38. Morris U, Khamis M, Aydin-Schmidt B, Abass AK, Msellem MI, Nassor MH, et al. Field deployment of loop-mediated isothermal amplification for centralized mass-screening of asymptomatic malaria in Zanzibar: a pre-elimination setting. *Malar J.* 2015;14:205.

39. Cook J, Aydin-Schmidt B, González IJ, Bell D, Edlund E, Nassor MH, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for point-of-care detection of asymptomatic low-density malaria parasite carriers in Zanzibar. *Malar J.* 2015;14:43.

40. Vásquez AM, Zuluaga L, Tobón A, Posada M, Vélez G, González IJ, et al. Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for screening malaria in peripheral and placental blood samples from pregnant women in Colombia. *Malar J.* 2018;17(1):262.

41. Britton S, Cheng Q, McCarthy JS. Novel molecular diagnostic tools for malaria elimination: a review of options from the point of view of high-throughput and applicability in resource limited settings. *Malar J*. 2016;15(1):88.
42. Roth JM, Korevaar DA, Leeflang MM, Mens PF. Molecular malaria diagnostics: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2016;53(2):87-105.
43. Slater HC, Ross A, Felger I, Hofmann NE, Robinson L, Cook J, et al. The temporal dynamics and infectiousness of subpatent *Plasmodium falciparum* infections in relation to parasite density. *Nat Commun*. 2019;10(1):1433.
44. Lindblade KA, Steinhardt L, Samuels A, Kachur SP, Slutsker L. The silent threat: asymptomatic parasitemia and malaria transmission. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2013;11(6):623-39.
45. Artavanis-Tsakonas K, Tongren JE, Riley EM. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. *Clin Exp Immunol*. 2003;133(2):145-52.
46. Iwagami M, Keomalaphet S, Khattignavong P, Soundala P, Lorphachan L, Matsumoto-Takahashi E, et al. The detection of cryptic *Plasmodium* infection among villagers in Attapeu province, Lao PDR. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(12):e0006148.
47. Baum E, Sattabongkot J, Sirichaisinthop J, Kiattibutr K, Davies DH, Jain A, et al. Submicroscopic and asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections are common in western Thailand - molecular and serological evidence. *Malar J*. 2015;14:95.
48. Osier FH, Fegan G, Polley SD, Murungi L, Verra F, Tetteh KK, et al. Breadth and magnitude of antibody responses to multiple *Plasmodium falciparum* merozoite antigens are associated with protection from clinical malaria. *Infect Immun*. 2008;76(5):2240-8.
49. Reddy SB, Anders RF, Beeson JG, Färnert A, Kironde F, Berenzon SK, et al. High affinity antibodies to *Plasmodium falciparum* merozoite antigens are associated with protection from malaria. *PLoS One*. 2012;7(2):e32242.
50. Shekalaghe S, Alifrangis M, Mwanziva C, Enevold A, Mwakalinga S, Mkali H, et al. Low density parasitaemia, red blood cell

polymorphisms and *Plasmodium falciparum* specific immune responses in a low endemic area in northern Tanzania. *BMC Infect Dis.* 2009;9:69.

51. Baum E, Sattabongkot J, Sirichaisinthop J, Kiattibutr K, Jain A, Taghavian O, et al. Common asymptomatic and submicroscopic malaria infections in Western Thailand revealed in longitudinal molecular and serological studies: a challenge to malaria elimination. *Malar J.* 2016;15:333.

52. Doolan DL, Dobaño C, Baird JK. Acquired immunity to malaria. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(1):13-36, Table of Contents.

53. Marsh K, Kinyanjui S. Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunol.* 2006;28(1-2):51-60.

54. Woodberry T, Minigo G, Piera KA, Hanley JC, de Silva HD, Salwati E, et al. Antibodies to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 5 in Indonesia: species-specific and cross-reactive responses. *J Infect Dis.* 2008;198(1):134-42.

55. Alves FP, Gil LH, Marrelli MT, Ribolla PE, Camargo EP, Da Silva LH. Asymptomatic carriers of *Plasmodium* spp. as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon. *J Med Entomol.* 2005;42(5):777-9.

56. Bousema T, Okell L, Felger I, Drakeley C. Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. *Nat Rev Microbiol.* 2014;12(12):833-40.



## **Capítulo 4.**

### **4. Persistencia de las infecciones submicroscópicas en el tiempo en una zona endémica para malaria en Colombia**

#### **4.1. Introducción**

La implementación en los últimos años de pruebas moleculares más sensibles para el diagnóstico de *Plasmodium* spp., ha sacado a la luz la magnitud de la prevalencia de las infecciones de baja densidad parasitaria (1). Estas infecciones en su mayoría son asintomáticas y submicroscópicas ya que sus parasitemias están por debajo del límite de detección de la microscopía de luz y las pruebas de diagnóstico rápido (2, 3). Este tipo de infecciones se encuentran en todos los entornos endémicos, incluidos los que se acercan a la eliminación y se han identificado en todas las edades de la población (2, 3). Adicionalmente diversos estudios han puesto de manifiesto su potencial como reservorios de transmisión de la infección ya que se ha demostrado que son infectivas para los mosquitos vectores de la malaria (4-6).

Las infecciones submicroscópicas han sido catalogadas como un marcador potencial de micro heterogeneidad de transmisión, se ha sugerido que éstas deben ser identificadas y tratadas para prevenir la morbilidad futura y la transmisión en los lugares donde es altamente probable que los individuos desarrollen futuras infecciones sintomáticas (7). No obstante, gran parte de la información que se conoce sobre estas infecciones proviene de estudios transversales que si bien han arrojado información valiosa, solo muestran una mirada en un momento particular y son menos informativos sobre su comportamiento a lo largo del tiempo (8).

Se requiere de una mejor comprensión de la dinámica de las infecciones submicroscópicas para dilucidar si en el contexto de los programas de vigilancia y control de la malaria, es necesario identificarlas y tratarlas. Si estas infecciones son principalmente de corta duración, destinadas a desaparecer rápidamente sin tratamiento, es probable que su contribución a la transmisión sea poca y tratarlas no sería una prioridad. Si por el contrario, estas infecciones tienen la capacidad de persistir por tiempos prolongados a bajas densidades parasitarias, su tratamiento podría prevenir largos períodos de infección que podrían tener no solo consecuencias para la salud del individuo portador, sino que además,

favorecería la transmisión y con ello obstaculizaría el logro de los objetivos de los programas de control y eliminación de la malaria (8, 9).

Las infecciones sintomáticas por *Plasmodium* spp. a menudo son de corta duración ya que quienes las portan tienen más probabilidades de buscar y recibir tratamiento que su contraparte asintomática (8). Diferentes series y reportes de caso han demostrado que las infecciones asintomáticas por *Plasmodium* spp. no tratadas pueden persistir hasta por 13 años (10), sin embargo, la duración promedio de este tipo de infecciones con un mismo genotipo del parásito en una zona de alta transmisión se ha estimado entre 5 a 7 meses para *P. falciparum*, mientras que, en áreas de baja transmisión la persistencia reportada ha sido un poco menor, entre 2 a 4 meses para *P. falciparum* y 4 a 6 meses para *P. vivax* (11, 12). No obstante, estas estimaciones no son precisas ya que en algunos estudios se administró tratamiento antimalárico durante el seguimiento y en otros no fue posible establecer si el genotipo del parásito identificado al ingreso al estudio fue el mismo durante el seguimiento (11, 12). Pese a esto, los datos demuestran que estas infecciones pueden ser crónicas y estar presentes en una amplia gama de áreas endémicas, siendo su frecuencia y duración probablemente específicas de cada contexto.

Además de conocer la persistencia de las infecciones submicroscópicas, la comprensión de los factores que la modulan es fundamental para identificar las poblaciones con mayor probabilidad de albergar este tipo de infecciones y establecer las medidas de control necesarias. Se cree que las infecciones submicroscópicas son el producto de una exposición repetida al parásito y ocurre como consecuencia de la inmunidad desarrollada a lo largo de la vida, que previene los episodios sintomáticos al controlar la cantidad de parásitos pero sin alcanzar una inmunidad estéril (13, 14). Por otra parte, también se ha postulado que el fenómeno de tolerancia, el cual consiste en la adaptación del hospedero a las infecciones continuas, principalmente mediante la regulación de la inflamación generada por el sistema inmune innato (15), puede explicar la cronicidad de las infecciones por *Plasmodium* spp. al haber una "tregua" entre el hospedero y el parásito que permite que coexistan sin grandes pérdidas para ambos (16).

Si bien se ha documentado que los niveles de anticuerpos anti-*Plasmodium* disminuyen casi a niveles indetectables varios meses o incluso semanas después de un episodio de malaria aguda (17), se cree

que la inmunidad a la enfermedad solo se adquiere después de años de infecciones repetidas ya que los niveles de anticuerpos específicos contra antígenos del parásito parecen aumentar de manera gradual con la edad en áreas endémicas (18, 19), y los anticuerpos decaen a tasas más lentas en individuos mayores que en niños pequeños en la misma área endémica (20). Consistente con estos datos, un modelo matemático propuesto por White *et al.* (2014) sugiere que la respuesta humoral contra *Plasmodium* spp. incluye tanto anticuerpos de corta duración, responsables de aumentar los títulos de anticuerpos después de la infección, como de larga duración (3-9 años) cuya función es mantener respuestas humorales sostenidas por tiempos prolongados (21).

Pese a que hay varios reportes que muestran una asociación potencial entre una mayor cantidad de anticuerpos anti *Plasmodium* con las infecciones asintomáticas en comparación con las sintomáticas (22, 23), también hay estudios que contradicen estos hallazgos (24, 25) y hasta la fecha no se ha caracterizado si un mayor nivel de anticuerpos en las personas con infecciones submicroscópicas se asocia a su vez con una mayor persistencia o eliminación de las infecciones en el tiempo.

Si bien por mucho tiempo se pensó que la inmunidad en áreas de baja transmisión era más baja que en las de alta transmisión, se ha documentado que las infecciones de baja densidad son más frecuentes en zonas de baja transmisión (9, 26) sugiriendo que en estas áreas hay una respuesta inmunitaria supresora de parásitos más eficientemente de lo que se creía, producto probablemente de una baja diversidad genética de las poblaciones de parásitos que permite a los individuos adquirir rápidamente inmunidad a los pocos clones circulantes (27, 28). En Colombia, país considerado de baja transmisión para malaria, la prevalencia de infecciones de baja densidad oscila entre un 1,3% a un 15% (29-31), no obstante su duración y los factores que la condicionan aún no han sido explorados.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue estimar el tiempo promedio de persistencia de las infecciones submicroscópicas en una zona endémica para malaria en Colombia e identificar los factores asociados con la persistencia de estas infecciones. Desde una perspectiva biológica y de salud pública, no solo es importante conocer la prevalencia las infecciones de baja densidad, sino además estimar el curso de dichas infecciones en el tiempo para establecer si es necesario identificarlas y tratarlas. Lo anterior porque a la luz de la evidencia actual, las infecciones de baja

densidad parasitaria representan un gran reservorio oculto que debe ser eliminado si se desea eliminar la malaria, no obstante sino se conocen sus factores condicionantes, se corre el riesgo de que una vez que se eliminen estas infecciones, la inmunidad generada con el paso del tiempo se pierda, acarreando posteriormente un problema mayor en zonas endémicas donde se supone está controlada la malaria.

## **4.2. Métodos**

**4.2.1. Diseño del estudio.** Se diseñó un estudio observacional longitudinal prospectivo en donde los individuos con infección submicroscópica identificados en la fase transversal (Capítulo 3) fueron evaluados entre 8 a 10 semanas con los dos primeros seguimientos semanales y los subsiguientes cada 2 semanas.

**4.2.2. Sitios y población de estudio.** Los sitios de estudio y la población fueron descritos previamente (Capítulo 3). Para la fase longitudinal se incluyeron sólo los individuos con infecciones submicroscópicas (Microscopía negativa y LAMP positiva) al ingreso al estudio, con una temperatura axilar  $<37,5^{\circ}\text{C}$ , mayores de dos años de edad, sin diagnóstico previo de malaria y/o consumo de tratamiento antimalárico en las últimas 4 semanas, sin planes de trasladarse de su lugar de residencia en los dos meses posteriores a la inclusión al estudio y en caso de ser mujer, no estar en etapa de gestación.

**4.2.3. Tamaño de la muestra.** El cálculo del tamaño de la muestra se estimó para un análisis de supervivencia empleando el modelo de riesgos proporcionales de Cox dado que la respuesta al principal objetivo del proyecto se dio en el marco de un diseño longitudinal. Como en Colombia no se han realizado estudios sobre la persistencia de las infecciones submicroscópicas por *Plasmodium* spp., se tomó como referencia para el cálculo del tamaño de la muestra, la probabilidad de falla del 0,7 (eliminación de la parasitemia) reportada por Tripura *et al.* (2016) en un estudio realizado en una zona de baja transmisión en Tailandia (12) y un Odds Ratio (OR) de 2,5 correspondiente a tener más de 1 episodio de previo de malaria durante la vida de un estudio realizado en Colombia (31). Con esta información y con un nivel de significación de 0,05, una potencia del 80%, una variabilidad (desviación estándar de la variable independiente) de 0,5 y asumiendo que no hay correlación entre las variables, el tamaño de la muestra calculado fue de 54; asumiendo además un porcentaje de pérdidas durante el seguimiento del 20%, el

tamaño de muestra ideal es de 68, este valor es cercano al número de infecciones submicroscópicas identificadas en la fase transversal (n=66) (Sup C4.1).

**4.2.4. Seguimiento de los participantes.** El seguimiento de los individuos con infección submicroscópica estuvo a cargo de dos auxiliares de laboratorio/enfermería entrenados en toma de muestras y en la evaluación de signos y síntomas de la enfermedad.

En cada control se tomó una muestra por punción capilar para el diagnóstico microscópico (gota gruesa) y molecular (LAMP) (Anexo C3.5). Además de la encuesta clínica y epidemiológica realizada al ingreso al estudio, en cada control se diligenció un formulario de valoración de signos y síntomas y desplazamiento a otros lugares (Anexo C3.5). Se invitó a los participantes del estudio a contactar con el personal de campo en caso de presentar fiebre u otros síntomas sugestivos de malaria en los días diferentes al control. A todos los participantes se les hizo la medición de los niveles de anticuerpos solamente al ingreso al estudio, la metodología fue previamente descrita en el capítulo tres.

Aquellos participantes con gota gruesa positiva y sin síntomas fueron contactados diariamente para indagar la aparición de síntomas relacionados con malaria y en aquellos que presentaron síntomas se les administró tratamiento antimalárico de acuerdo a las guías nacionales (32). Al final del seguimiento, todos los participantes que permanecieron infectados con *Plasmodium* spp. recibieron tratamiento antimalárico independiente de la presencia de síntomas.

#### **4.2.5. Definiciones**

**4.2.5.1. Infección submicroscópica afebril.** Participante con infección por *Plasmodium* spp. detectada por LAMP pero no por microscopía con una temperatura axilar <37,5°C

**4.2.5.2. Infección persistente.** Participante con infección por *Plasmodium* spp. detectada por LAMP, microscopía o ambas en el último seguimiento realizado y con una temperatura axilar <37,5°C.

**4.2.5.3. Negativización de la infección.** No detección del parásito por la prueba de LAMP ni por microscopía en al menos tres seguimientos consecutivos en ausencia de tratamiento antimalárico.

**4.2.6. Análisis estadístico.** Todos los datos consignados en los formularios de cada participante fueron registrados en una base de datos en Microsoft Access y el análisis estadístico se realizó en Stata/MP V14.0. Para todos los análisis se usó un nivel de significación estadística de 0,05.

La variable dependiente analizada fue el tiempo transcurrido desde la detección de la infección submicroscópica afebril por *Plasmodium* spp. hasta la negativización de la infección. Además de clasificar como censura la infección persistente al finalizar el estudio y la pérdida durante el seguimiento, aquellos individuos en los que no se logró confirmar la negativización, se clasificaron como censura en el último seguimiento positivo. También se consideró como censura la presencia de infección microscópica acompañada de una temperatura axilar  $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$  dado que estas infecciones tuvieron que ser tratadas inmediatamente y por lo tanto no continuaron en el seguimiento. En el Sup C4.2 se presentan los seguimientos realizados en cada participante agrupados según el desenlace del estudio.

Se construyó una tabla de vida (33) por semana para calcular la probabilidad acumulada de persistencia y la probabilidad condicional de negativización en cada periodo. Se estimó además el tiempo promedio transcurrido desde la detección de la infección submicroscópica afebril por *Plasmodium* spp. hasta la negativización de la infección mediante la curva de supervivencia estimada con el método de Kaplan Meier (34).

Adicionalmente, mediante la prueba de log Rank test (35, 36) se compararon las curvas de persistencia según auto-reporte de malaria en toda la vida (si/no), auto-reporte de malaria en el último año (si/no), edad ( $\leq 5$  años y  $> 5$  años) y niveles altos y bajos de IgG anti Pf-MSP1, Pf-AMA1, Pv-MSP, Pv-121 e IgM anti Pf-MSP1 clasificados según el percentil 50 del  $\Delta\text{DO}$  para cada anticuerpo en los individuos con infección submicroscópica (Sup C4.3).

Se estimó el efecto de las variables del hospedero (antecedentes de malaria y niveles de anticuerpos) con el desenlace del estudio mediante un modelo de riesgos proporcionales de Cox que estima el Hazard Ratio (HR) como el exponencial del  $\beta$  asociado al factor y como medida de la magnitud de la asociación (37). Los análisis se hicieron de manera cruda y ajustada por la edad para cada una de estas variables. Se valoró el supuesto de riesgos proporcionales de Cox mediante el análisis de los

residuales de Shoenfeld y el análisis gráfico de las curvas log-log de la supervivencia contra el tiempo para las variables categóricas (38).

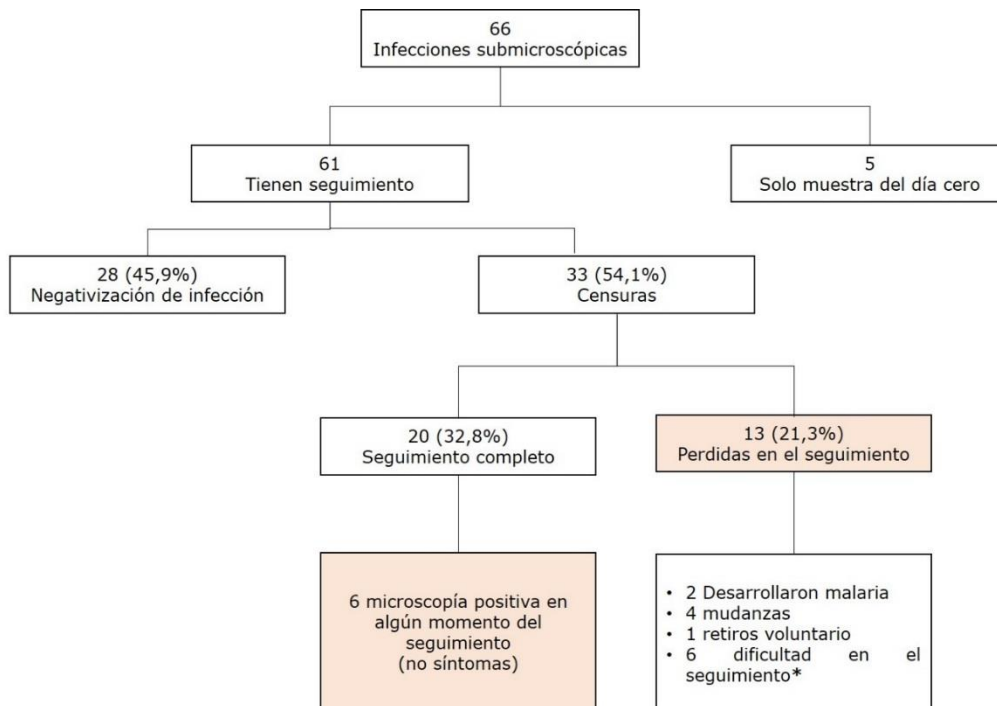
**4.2.7. Consideraciones éticas.** Este estudio fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia (Acta 014 del 09 de agosto de 2017) (Anexo C3.6). La firma del consentimiento y/o asentimiento informado de todos los participantes se obtuvo antes de la obtención de la muestra y de la recolección de los datos.

### **4.3. Resultados**

De los 958 individuos incluidos en la fase transversal, 66 (6,9%) presentaron infecciones submicroscópicas (Tabla C3.1) y fueron seguidos hasta por 10 semanas para la evaluación de la persistencia. La mediana de la edad de estos individuos fue de 27 años (RI=11-40), el 56% fueron mujeres, 41 (62,0%) manifestaron haber tenido malaria en el pasado y el 51% (21/41) reportaron haber sufrido más de un episodio.

Con respecto los niveles de anticuerpos, la mediana de IgG anti Pf-MSP1 fue de 0,840 (RI= 0,478-1,02); 0,449 (RI=0,386-0,514) para anti Pf-AMA1; 0,723 (RI= 0,281-1,102) para Pv-MSP1 y de 0,139 (RI=0,115-0,170) para Pv-121. A pesar de que 38% (n=25) de los individuos con infección submicroscópica manifestaron no haber sufrido nunca de malaria, la gran mayoría de ellos fueron positivos para los anticuerpos IgG evaluados en este estudio cuando sus niveles se compararon con los niveles de anticuerpos de 36 ciudadanos norteamericanos que refieren nunca haber salido del país en toda la vida y probablemente nunca han estado expuestos al parásito (Sup C3.1).

De acuerdo a las definiciones propuestas, 28 (45,9%) individuos presentaron el evento de interés, 20 (32,8%) permanecieron infectados hasta el fin del seguimiento y fueron clasificados como censuras, al igual que las pérdidas durante el seguimiento (n=13; 21,3%) (Figura C4.1).



\*Después de la semana 8, se logró obtener una muestra adicional de 5 participantes: 4 seguían teniendo infección submicroscópica (semana 15, 16, 19 y 20) y uno fue negativo a la semana 13 y 19.

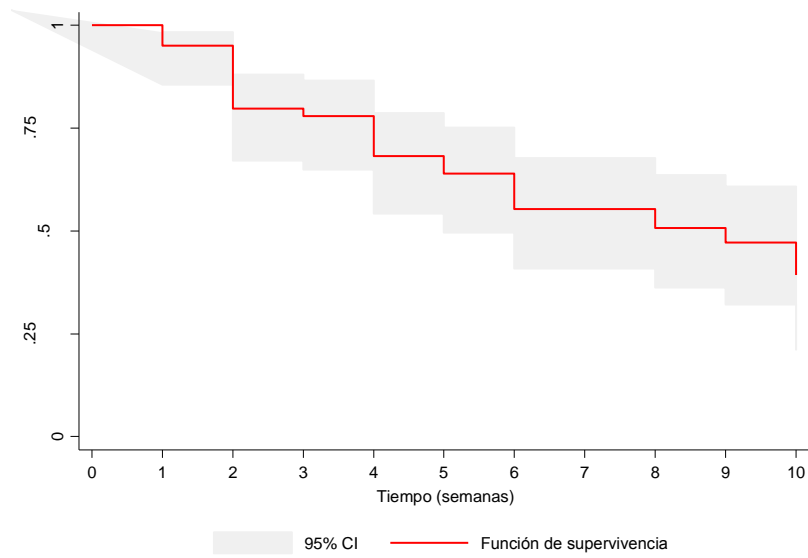
**Figura C4.1** Diagrama de flujo de los participantes con infección submicroscópica

**4.3.1. Tiempo promedio de persistencia de las infecciones submicroscópicas.** Si bien se identificaron 66 participantes con infecciones submicroscópicas, en 5 de ellos sólo se obtuvo la muestra del día cero, y por ello solo 61 participantes fueron considerados para el análisis de persistencia. El tiempo total de seguimiento fue de 330 semanas y la tasa de negativización de la infección fue 8,5/100 personas/semana; para la semana 9, la persistencia de las infecciones submicroscópicas fue del 50% (Tabla C4.1, Figura C4.2).



**Tabla C4.1** Persistencia de infecciones submicroscópicas en el municipio de Tumaco, Nariño

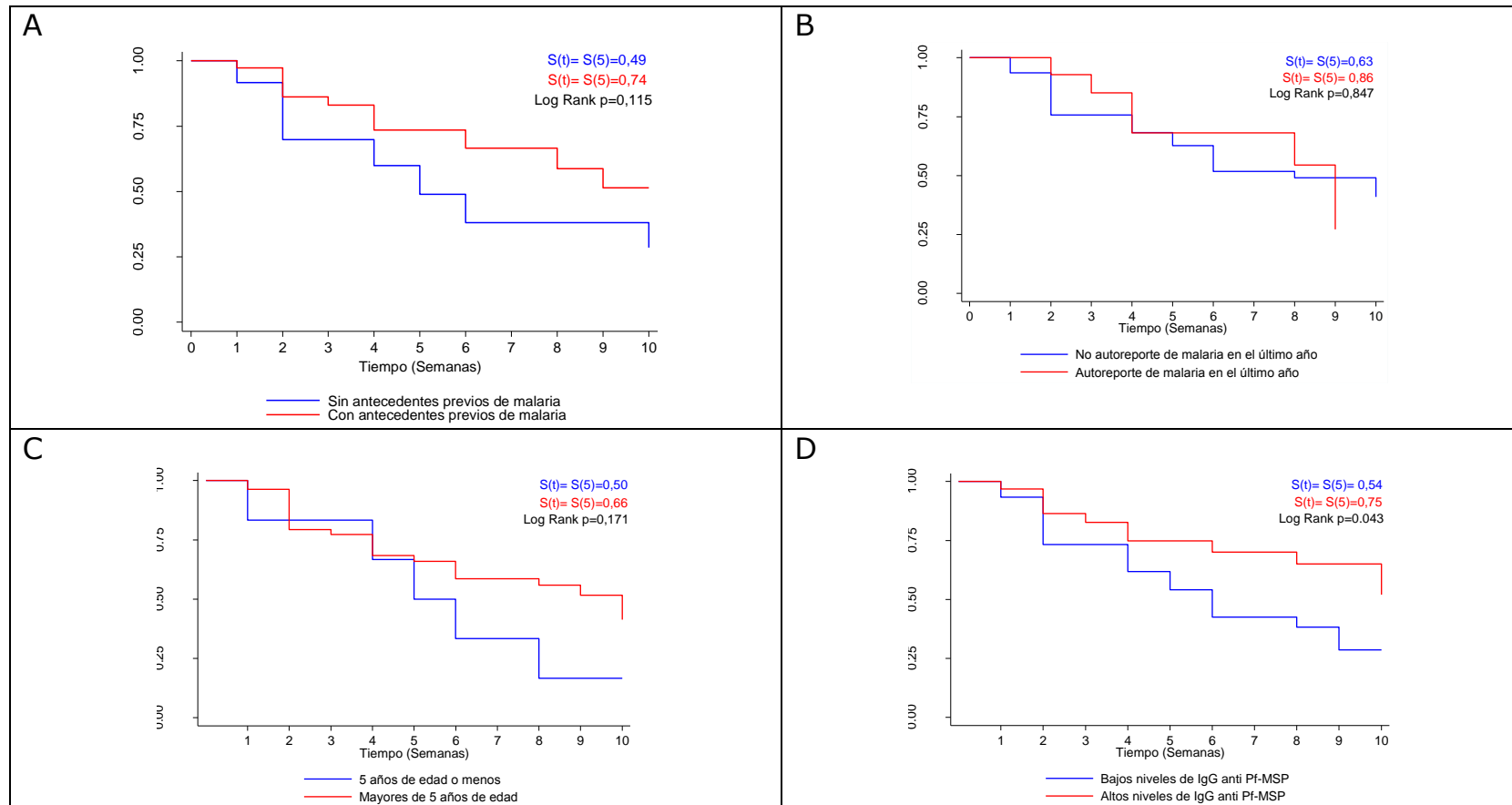
Semana	Infecciones submicroscópicas	Número de Negativización	Numero de censuras	Probabilidad de negativización	Probabilidad de persistir	Probabilidad acumulada de persistir	Error estándar	IC 95%
0	66	0	5	0,00	1,00	1,00	0,00	
1	61	3	2	0,05	0,95	0,95	0,03	0,85 - 0,98
2	56	9	5	0,17	0,83	0,79	0,05	0,66 - 0,88
3	42	1	1	0,02	0,98	0,77	0,06	0,64 - 0,86
4	40	5	3	0,13	0,87	0,67	0,06	0,53 - 0,78
5	32	2	0	0,06	0,94	0,63	0,07	0,48 - 0,74
6	30	4	1	0,14	0,86	0,54	0,07	0,40 - 0,67
7	25	0	1	0,00	1,00	0,54	0,07	0,40 - 0,67
8	24	2	8	0,10	0,90	0,49	0,07	0,34 - 0,62
9	14	1	7	0,10	0,90	0,44	0,08	0,29 - 0,59
10	6	1	5	0,29	0,71	0,32	0,12	0,11 - 0,55



**Figura C4.2.** Curva de Kaplan-Meier para la estimación de la persistencia de las infecciones submicroscópicas en el tiempo empleando la prueba LAMP

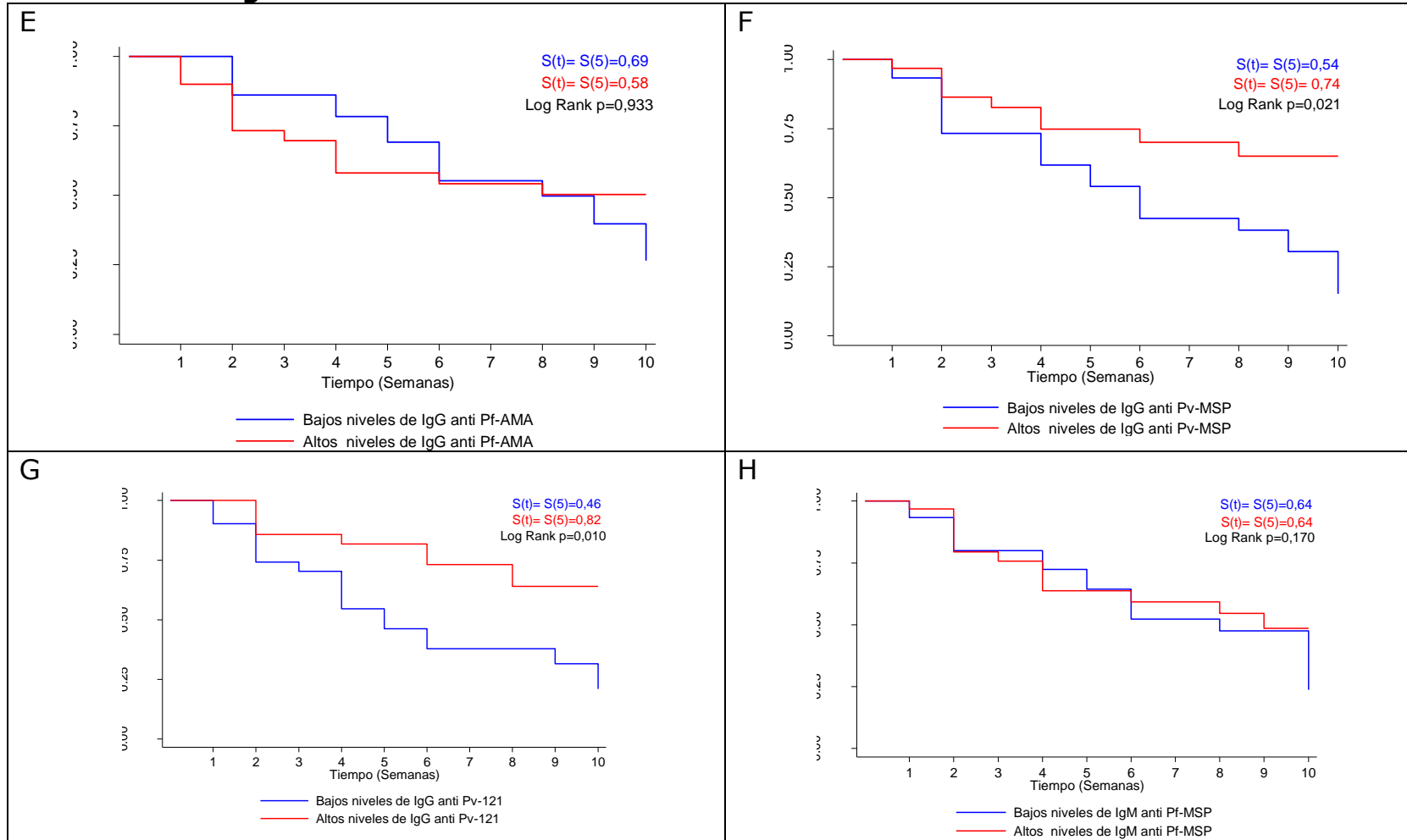
Cuando se compararon las curvas de persistencia entre quienes tenían o no antecedentes de malaria, se observó una mayor persistencia de las infecciones en quienes reportaron antecedentes de malaria (7/100 individuos/semana) en comparación con quienes no (tasa de negativización de 12/100 individuos/semana) con un valor  $p=0,115$  (Figura C4.3 A). Un comportamiento similar se observó con el auto-reporte de malaria en el último año ( $p=0,847$ ) (Figura C4.3 B). Con respecto a la edad, se observó que a mayor edad, la persistencia es mayor (tasa de negativización de 8/100 individuos/semana en  $\leq 5$  años Vs 15/100 individuos/semana en mayores de 5 años;  $p= 0,171$ ) (Figura C4.3 C).

No obstante, cuando se compararon los niveles de IgG, para todos los anticuerpos, excepto para anti Pf-AMA1, hubo una mayor persistencia de las infecciones submicroscópicas en los individuos que tenían niveles de anticuerpos por encima del percentil 50 (altos niveles). Por el contrario, para el caso de IgM anti Pf-MSP1, las curvas de persistencia son similares entre quienes tienen un nivel de anticuerpos por encima y por debajo del percentil 50 (Figura C4.3 D-H).



**Figura C4.3** Curva de Kaplan-Meier para la estimación de la persistencia de las infecciones submicroscópicas en el tiempo empleando la prueba LAMP según antecedentes de malaria en toda la vida (A) y en el último años (B), según la edad (C), IgG anti Pf-MSP1 (D), IgG anti Pf-AMA1 (E), IgG anti Pv-MSP1 (F), anti Pv-121 (G) y IgM anti Pf-MSP1 (H).

### Continuación Figura C4.3



**4.3.2. Factores asociados a la persistencia de las infecciones submicroscópicas.** En el modelo de regresión de Cox se observó que si bien los antecedentes de malaria durante toda la vida y en el último año no se asociaron con la persistencia de las infecciones submicroscópicas, los niveles de anticuerpos podrían explicarla. Cuando se analiza esta variable de manera cuantitativa ( $\Delta DO$ ) se observa que a medida a medida que incrementan los niveles de IgG Pf-MSP1 y Pv-MSP1 hay un 70-82% menos riesgo de negativizar la infección (HR= 0,18; IC 95%=0,05-0,63 y HR=0,30; IC 95%=0,12-0,79 respectivamente). En otras palabras, a mayor nivel de IgG, hay una mayor persistencia de la infección (Tabla C4.2).

Resultados similares se encontraron cuando la variable de anticuerpos fue medida de manera categórica como bajos y altos niveles, en este caso se encontró que quienes tienen altos niveles de anticuerpos Pv-MSP1 tienen 60% menos riesgo de negativizar la infección en comparación con quienes tienen bajos niveles (HR=0,40; IC 95%=0,17-0,92) (Sup C4.4).

Independiente como se incluya la variable de nivel de anticuerpos en el modelo (cuantitativa o cualitativa), los resultados proponen que la respuesta inmune humoral frente a *Plasmodium* spp. está relacionada de manera significativa con la persistencia de las infecciones. En todas las variables, excepto para Pf-AMA1 categorizada, la razón de riesgos fue constante a través del tiempo cumpliendo con el supuesto de riesgos proporcionales del modelo de Cox (Sup C4.5, Sup C4.6).

**Tabla C4.2** Asociación entre los antecedentes de malaria y los niveles de anticuerpos con la negativización de la infección

Característica	Negativización de la infección				HR crudo			HR ajustado (edad)		
	No		Yes		HR	IC 95%		HR	IC 95%	
<b>Malaria previa toda la vida, n (%)</b>										
Ninguno	11	(44)	14	(56)	1*			1		
≥1,	27	(65,8)	14	(34,2)	0,5	0,2	- 1,20	0,5	0,2	- 1,20
					7	7		7	7	
<b>Malaria en el último año</b>										
Ninguno, n (%)	27	(55,1)	22	(44,9)	1*			1	0,4	- 2,44
≥1, n (%)	11	(64,7)	6	(35,3)	0,9	0,3	- 2,28	0,9	0,3	- 2,28
					2	7		2	7	
<b>Nivel de anticuerpos IgG, ΔDO; Mediana (RI)</b>										
<b>IgG</b>										
Pf-MSP1	0.92	(0,571-1,075)	0,58	(0,381-0,956)	0,1	0,0	- 0,64	0,1	0,0	- 0,63
	6		6		9	6		8	5	
Pv-MSP1	0.95	(0,457-1,142)	0,41	(0,163-0,904)	0,3	0,1	- 0,80	0,3	0,1	- 0,79
	1		9		2	3		0	2	
Pf-AMA1	0.44	(0,381-0,514)	0,45	(0,393-0,561)	1,4	0,0	- 40,7	1,8	0,0	- 68,8
	8		2		3	5	- 1	1	5	- 1
Pv-121	0.14	(0,131-0,175)	0,12	(0,108-0,163)	0,1	0,0	- 11,2	0,0	0,0	- 11,1
	7		7		4	0	- 8	0	0	- 2
<b>IgM</b>										
Pf-MSP1	0.04	(0,026-0,095)	0,03	(0,022-0,077)	1,2	0,4	- 3,80	1,2	0,4	- 3,71
	5		8		4	1		3	1	

RI: Rango intercuartil, ΔDO: intensidad óptica corregida, HR: Hazard Ratio, IC: intervalo de confianza,\* Categoría de referencia

#### 4.4. Discusión

En la fase transversal de este estudio se reportó una prevalencia de infección submicroscópica de 6,9% (Tabla C3.1) similar a reportes previos en el municipio de Tumaco (29-31), no obstante, la estimación de la duración de estas infecciones no había sido explorada anteriormente en Colombia. Nuestros hallazgos indican que una gran proporción de infecciones submicroscópicas persisten entre las semanas 8 y 10 de seguimiento (45%; IC 95% 29-59%). Además, 5 de 6 individuos clasificados como perdidos en el seguimiento, presentaron un seguimiento positivo por fuera de los tiempos establecidos para el análisis de persistencia (posterior a la semana 10), sugiriendo que la proporción de personas que persisten puede ser mayor. No obstante, debido a que no fue posible genotipificar las infecciones submicroscópicas por las bajas parasitemias, la posibilidad que un individuo haya adquirido una nueva infección durante el seguimiento no se puede excluir (9), lo anterior podría generar una sobrestimación de la persistencia reportada (11). Sin embargo dado que el tiempo de seguimiento no fue muy extenso, la posibilidad de una nueva infección es menos probable.

Nguyen *et al.* (2018) reportaron una mediana de la duración de las infecciones por *P. falciparum* de dos meses (RI=1-3 meses) en un área de baja transmisión en Vietnam (11), estos resultados son similares a nuestros hallazgos donde la mayoría de las infecciones submicroscópicas detectadas fueron por esta especie (65,2%), sin embargo, el seguimiento en el presente trabajo fue más corto (alrededor de dos meses y medio Vs 24 meses) y no se puede establecer si estas infecciones pueden persistir más allá de la semana 10. Por otra parte, debido a que el 37,5% de las infecciones en este trabajo se clasificaron como *Plasmodium spp.*, es probable que una proporción de éstas infecciones sean por *P. vivax* y su persistencia sea mayor como se ha reportado previamente para esta especie (11, 12).

En contraste con nuestros hallazgos, en un área de baja transmisión en Cambodia se reportó que 21/24 (87%) participantes con infección mixta o mono-infección por *P. falciparum* eliminaron la infección después de un mes sin haber recibido tratamiento (12), no obstante los seguimientos en dicho trabajo fueron mensuales y no se puede descartar que, debido a las fluctuaciones normales en las parasitemias en el tiempo, las cuales oscilan entre infecciones de ultra baja densidad, submicroscópicas y microscópicas (9, 11), la muestra clasificada como negativa en el



seguimiento del primer mes pudo haber tenido una parasitemia de muy baja densidad sin necesariamente haber eliminado la infección en ese momento. No obstante, en dicho trabajo se empleó una PCR ultrasensible donde la probabilidad de detección de infecciones de muy baja densidad es alta.

En Latinoamérica también hay algunos reportes de la dinámica de estas infecciones aunque los tiempos de seguimiento fueron más cortos. En Colombia se reportó que el 100% de los individuos con infecciones submicroscópicas permanecieron positivos por PCR al día 28 de seguimiento sin desarrollo de síntomas (31). Por su parte, en un estudio en Brasil se reportó que el 25% de individuos con infección asintomática y submicroscópica permanecieron con parasitemia sin desarrollar síntomas hasta por 30 días mientras que el 75% restante no se les detectó infección a partir de las dos primeras semanas de seguimiento (39). Cabe resaltar sin embargo que la proporción de la infección persistente en este estudio puede ser mayor si se tiene en cuenta que una proporción de estas infecciones pudieron estar en una fase de ultra baja densidad en la que la PCR empleada no logró detectar. Es por ello probable que la mayor persistencia de la infección observada en el actual trabajo obedezca a una definición más estricta de la eliminación de la infección (al menos tres seguimientos negativos consecutivos) en la que se tiene en cuenta las fluctuaciones de las parasitemias en el tiempo.

La diferencia en cuanto a los tiempos y frecuencia de seguimientos, las pruebas moleculares empleadas para la identificación de estas infecciones y la administración o no de tratamiento en los estudios previamente mencionados, dificultan la comparación entre ellos y por lo tanto la estimación precisa de la persistencia de las infecciones submicroscópicas. Debido a lo anteriormente expuesto, Slater *et al.* (2019), en una revisión sistemática cuyo propósito fue entender la dinámica temporal de estas infecciones, no pudieron estimar la duración promedio de estas infecciones (9).

Pese a las diferencias en el diseño de los estudios, en todos ellos se evidencia que, aunque en diferentes proporciones (13-59%), las infecciones submicroscópicas por *Plasmodium* spp. pueden persistir en el tiempo y aunque en algunos casos sean infecciones de corta duración y con baja capacidad infectiva en comparación con las infecciones microscópicas, estas infecciones son predictivas de infecciones detectables por microscopía que no solo amenazan al hospedero a

desarrollar un cuadro clínico sino que además potencialmente contribuyen a mantener la transmisión en la comunidad (9).

Con respecto a los factores asociados a la persistencia de las infecciones submicroscópicas, un incremento en los niveles de anticuerpos IgG anti Pf-MSP1, Pv-MSP1 y Pv-121 se asoció con una mayor persistencia de la infección submicroscópica. Si bien se ha descrito que es solo después de años de exposición repetida al parásito que los individuos que viven en áreas endémicas para malaria desarrollan una inmunidad clínica y antiparasitaria (sin lograr una inmunidad estéril) (40), previos estudios han sugerido que los anticuerpos contra los antígenos de *Plasmodium* spp. se generan de manera ineficiente y se pierden rápidamente en varios meses e incluso semanas, en ausencia de exposición continua (13), indicando que la persistencia de las infecciones submicroscópicas observadas en este estudio podrían ser el producto de anticuerpos producidos por la infección actual más que del cúmulo de anticuerpos de previas exposiciones.

En contraposición con lo anterior, también se ha documentado que los niveles de anticuerpos específicos contra *Plasmodium* spp. parecen aumentar de manera gradual con la edad (41) y que sus niveles decaen más lentamente a medida que aumenta la edad (20). También se ha documentado la presencia de anticuerpos de larga vida contra las proteínas MSP (42). De hecho, White *et al.* (2014) propuso un modelo que explica la respuesta inmune frente a *Plasmodium* spp. que contiene tanto anticuerpos de vida corta (vida media de 2 a 10 días) como de vida larga (vida media de 3 a 9 años), los cuales son responsables de aumentar los títulos de anticuerpos después de la infección y de mantener las respuestas humorales sostenidas respectivamente (21). Este modelo fue validado recientemente en adultos diagnosticados con malaria por *P. falciparum* en Suecia con y sin antecedentes de malaria durante su estadía en África subsahariana. Los autores encontraron que si bien la mayoría de los individuos montaron respuestas de anticuerpos detectables hacia antígenos del merozoíto de *P. falciparum* en el momento del diagnóstico, la magnitud y la amplitud de la respuesta fue mayor en quienes tenían episodios previos de malaria. En estos individuos los niveles de anticuerpos durante el primer año fueron 2-9 veces más altos comparados con los que no tenían exposición previa y la vida media de los anticuerpos de larga vida fue de 1,8 a 3,7 años. En conjunto, esto indica que los altos niveles de anticuerpos IgG detectados en los individuos con persistencia de las infecciones submicroscópicas en este

estudio, podrían ser producto tanto de la exposición crónica actual (anticuerpos de vida corta), como de exposiciones previas (anticuerpos de larga vida).

En este sentido y contrario a lo que se esperaría; que altos niveles de anticuerpos permitan un mejor control de la infección y un subsecuente aclaramiento de la misma, nuestros hallazgos podrían sugerir que probablemente el mayor nivel de anticuerpos IgG, el cual está asociado con mayor exposición previa al parásito, esté indicando de manera indirecta que el fenómeno de tolerancia al parásito toma lugar en las infecciones submicroscópicas persistentes. Esta capacidad de tolerar la presencia de un patógeno es una estrategia de defensa del hospedero que disminuye el impacto negativo y el daño tisular causados por los patógenos o por la respuesta inmune contra ellos (15), donde tanto el humano como el parásito pueden coexistir sin causar daño (16).

Si bien la inmunidad permite al hospedero el control de las parasitemias, la tolerancia consiste en la adaptación del hospedero a infecciones continuas (inmunidad anti-enfermedad), regulando principalmente la respuesta inflamatoria generada por el sistema inmune innato para evitar daños en los tejidos (16). Aunque en el presente trabajo no se evaluaron marcadores de inflamación que pudieran dar cuenta de una manera más clara el proceso de tolerancia, los mayores niveles de anticuerpos detectados en quienes persisten, podrían servir como un símil de la exposición pasada que ha permitido el desarrollo de la tolerancia a la infección (43-45). Recientemente un ensayo clínico controlado en donde inocularon esporozoítos de *Plasmodium* a individuos con altos y bajos niveles de anticuerpos, encontró que quienes tienen un mayor nivel de anticuerpos no solo hay un mejor control de las parasitemias, sino que además, la probabilidad de desarrollar síntomas en quienes tienen bajo nivel de anticuerpos es mayor que en quienes tienen altos niveles (90,0% y 33% respectivamente; prueba de log Rank  $p = 0.0008$ ) (46), lo anterior soporta la idea que los anticuerpos desarrollados en exposiciones previas al parásito se relaciona con la inmunidad anti-enfermedad.

El presente trabajo presenta varias limitaciones que es importante considerar. En primer lugar, debido a que no se conoce el momento exacto de la infección, es probable que haya una subestimación del periodo de persistencia.

En segundo lugar, debido a que se ha documentado que hay fluctuaciones de las parasitemias que llegan a ser indetectables (9, 11), es posible que algunas de las infecciones clasificadas como negativas, hayan estado en un periodo de parasitemia indetectable, no obstante, este sesgo trató de controlarse al clasificar como infección no persistente a quienes presentaran al menos tres mediciones negativas consecutivas.

En tercer lugar, si bien la probabilidad de reinfección es poca en áreas de baja transmisión, no se pueden excluir las reinfecciones como casuales de la persistencia observada. En el estudio se intentó hacer la genotipificación del parásito pero no fue posible por las bajas densidades parasitarias ( Sup **C4.7**).

Una cuarta limitación del estudio está relacionada con la prueba molecular empleada para la detección de las infecciones submicroscópicas (LAMP-Pan y LAMP-Pf), una considerable proporción de las infecciones solo se identificaron como *Plasmodium* spp. (37,5%). Dado que la mayor frecuencia de *P. falciparum* en el área estudiada y que cuatro muestras inicialmente clasificadas como *Plasmodium* spp., fueron positivas para gametocitos de *P. falciparum*, se espera que la proporción de las infecciones por esta especie en el estudio sea mayor. Sin embargo, la presencia de infecciones por *P. vivax* no se puede excluir. Esta dificultad para determinar la especie de *Plasmodium* puede obedecer a la baja carga parasitaria de las infecciones de baja densidad. Lo anterior, ha sido también reportado en previos estudios aunque en menor proporción (9,8%-12%) (11, 12), posiblemente porque en dichos estudios la extracción se hizo con mayor volumen de sangre y se empleó una uPCR.

En quinto lugar, si bien en este estudio se encontró que los niveles de Pf-MSP1 y Pv-MSP1 están asociados con la negativización de la infección, los intervalos de confianza de los HR fueron muy amplios; es probable que la persistencia de las infecciones submicroscópicas sea un fenómeno multicausal en el que otras variables que no se exploraron en este estudio estén implicadas en el desarrollo de este evento, por lo anterior, se requiere de un tamaño de muestra mayor que permita tener estimaciones más precisas, en las que además de inferir el riesgo de persistir con más precisión, se puedan incluir otras variables al modelo que ayuden a comprender mejor el fenómeno. En esta misma línea, otra de las dificultades para la estimación del tamaño de muestra fue la escasez de estudios para la elección de los parámetros para su cálculo, como el tamaño del efecto. Este estudio tuvo en cuenta para el cálculo del tamaño

de la muestra una razón de riesgos de 2,5 correspondiente a tener más de un episodio previo de malaria en toda la vida reportado en el único estudio en Colombia abordando factores de riesgo para infecciones submicroscópicas y asintomáticas (31). Si bien esta variable no estuvo significativamente asociada con la persistencia en este estudio, la dirección del efecto fue opuesta a la esperada (HR=0,57; IC 95% 0,27-1,20), probablemente porque la historia de malaria sea un factor que posibilita el tener una infección submicroscópica mas no su persistencia. Pese a todas las limitaciones expuestas previamente este es uno de los pocos estudios en Colombia en abordar la persistencia de las infecciones submicroscópicas además explorar sus factores asociados, y su posible relación con el fenómeno de tolerancia. Por lo tanto, se requiere de futuros estudios para continuar indagando como los procesos inflamatorios asociados a la tolerancia permiten explicar la duración de las infecciones submicroscópicas.

#### **4.5. Conclusiones**

Las infecciones submicroscópicas por *Plasmodium* spp. en una zona de baja transmisión en Colombia presentan una mediana de persistencia de 9 semanas y existe una relación entre su duración con un mayor nivel de anticuerpos anti *Plasmodium* indicando un posible fenómeno de tolerancia a la infección. Si bien se ha expuesto previamente que el reservorio de infecciones submicroscópicas deber ser removido si desea eliminar la malaria, se corre el riesgo que una vez tratadas, la inmunidad y la tolerancia generada entre el parásito y el hospedero producto de exposiciones previas se pierda, y la malaria sea un problema mayor incluso en áreas donde está actualmente controlada. Esto impone el reto no solo de detectar estas infecciones con métodos más sensibles y disponibles en campo, pero además el administrar los tratamientos adecuados, y más importante aún, de mantener acciones de control permanentes, los cual ha sido una de las mayores debilidades de los programas en el mundo.

#### **4.6. Referencias**

1. Britton S, Cheng Q, McCarthy JS. Novel molecular diagnostic tools for malaria elimination: a review of options from the point of view of high-throughput and applicability in resource limited settings. *Malar J.* 2016;15(1):88.

2. Okell LC, Ghani AC, Lyons E, Drakeley CJ. Submicroscopic infection in *Plasmodium falciparum*-endemic populations: a systematic review and meta-analysis. *J Infect Dis.* 2009;200(10):1509-17.
3. Bousema T, Okell L, Felger I, Drakeley C. Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. *Nat Rev Microbiol.* 2014;12(12):833-40.
4. Schneider P, Bousema JT, Gouagna LC, Otieno S, van de Vegte-Bolmer M, Omar SA, et al. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* gametocyte densities frequently result in mosquito infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;76(3):470-4.
5. Alves FP, Gil LH, Marrelli MT, Ribolla PE, Camargo EP, Da Silva LH. Asymptomatic carriers of *Plasmodium* spp. as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon. *J Med Entomol.* 2005;42(5):777-9.
6. Vallejo AF, García J, Amado-Garavito AB, Arévalo-Herrera M, Herrera S. *Plasmodium vivax* gametocyte infectivity in sub-microscopic infections. *Malar J.* 2016;15(1):48.
7. Mosha JF, Sturrock HJ, Brown JM, Hashim R, Kibiki G, Chandramohan D, et al. The independent effect of living in malaria hotspots on future malaria infection: an observational study from Misungwi, Tanzania. *Malar J.* 2014;13:445.
8. Drakeley C, Gonçalves B, Okell L, Slater H. Understanding the Importance of Asymptomatic and Low-Density Infections for Malaria Elimination. In: IntechOpen, editor. *Towards Malaria Elimination - A Leap Forward* 2018. p. 129-47.
9. Slater HC, Ross A, Felger I, Hofmann NE, Robinson L, Cook J, et al. The temporal dynamics and infectiousness of subpatent *Plasmodium falciparum* infections in relation to parasite density. *Nat Commun.* 2019;10(1):1433.
10. Ashley EA, White NJ. The duration of *Plasmodium falciparum* infections. *Malar J.* 2014;13:500.
11. Nguyen TN, von Seidlein L, Nguyen TV, Truong PN, Hung SD, Pham HT, et al. The persistence and oscillations of submicroscopic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections over time in Vietnam: an open cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(5):565-72.
12. Tripura R, Peto TJ, Chalk J, Lee SJ, Sirithiranont P, Nguon C, et al. Persistent *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections in a

western Cambodian population: implications for prevention, treatment and elimination strategies. *Malar J.* 2016;15(1):181.

13. Ryg-Cornejo V, Ly A, Hansen DS. Immunological processes underlying the slow acquisition of humoral immunity to malaria. *Parasitology.* 2016;143(2):199-207.

14. Marsh K, Kinyanjui S. Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunol.* 2006;28(1-2):51-60.

15. Medzhitov R, Schneider DS, Soares MP. Disease tolerance as a defense strategy. *Science.* 2012;335(6071):936-41.

16. Shanks GD. Tolerance May Be More Appropriate Than Immunity When Describing Chronic Malaria Infections. *Am J Trop Med Hyg.* 2019;100(3):497-500.

17. Kinyanjui SM, Conway DJ, Lanar DE, Marsh K. IgG antibody responses to *Plasmodium falciparum* merozoite antigens in Kenyan children have a short half-life. *Malar J.* 2007;6:82.

18. Crompton PD, Kayala MA, Traore B, Kayentao K, Ongoiba A, Weiss GE, et al. A prospective analysis of the Ab response to *Plasmodium falciparum* before and after a malaria season by protein microarray. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(15):6958-63.

19. Weiss GE, Clark EH, Li S, Traore B, Kayentao K, Ongoiba A, et al. A positive correlation between atypical memory B cells and *Plasmodium falciparum* transmission intensity in cross-sectional studies in Peru and Mali. *PLoS One.* 2011;6(1):e15983.

20. Akpogheneta OJ, Duah NO, Tetteh KK, Dunyo S, Lanar DE, Pinder M, et al. Duration of naturally acquired antibody responses to blood-stage *Plasmodium falciparum* is age dependent and antigen specific. *Infect Immun.* 2008;76(4):1748-55.

21. White MT, Griffin JT, Akpogheneta O, Conway DJ, Koram KA, Riley EM, et al. Dynamics of the antibody response to *Plasmodium falciparum* infection in African children. *J Infect Dis.* 2014;210(7):1115-22.

22. Vigan-Womas I, Lokossou A, Guillotte M, Juillerat A, Bentley G, Garcia A, et al. The humoral response to *Plasmodium falciparum* VarO rosetting variant and its association with protection against malaria in Beninese children. *Malar J.* 2010;9:267.

23. Leoratti FM, Durlacher RR, Lacerda MV, Alecrim MG, Ferreira AW, Sanchez MC, et al. Pattern of humoral immune response to *Plasmodium*

falciparum blood stages in individuals presenting different clinical expressions of malaria. *Malar J.* 2008;7:186.

24. Gomes LR, Totino PR, Sanchez MC, Daniel EP, Macedo CS, Fortes F, et al. Asymptomatic infection in individuals from the municipality of Barcelos (Brazilian Amazon) is not associated with the anti-Plasmodium falciparum glycosylphosphatidylinositol antibody response. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013;108(6):796-800.

25. Gavina K, Gnidehou S, Arango E, Hamel-Martineau C, Mitran C, Agudelo O, et al. Clinical Outcomes of Submicroscopic Infections and Correlates of Protection of VAR2CSA Antibodies in a Longitudinal Study of Pregnant Women in Colombia. *Infect Immun.* 2018;86(4).

26. Okell LC, Bousema T, Griffin JT, Ouédraogo AL, Ghani AC, Drakeley CJ. Factors determining the occurrence of submicroscopic malaria infections and their relevance for control. *Nat Commun.* 2012;3:1237.

27. Clark EH, Silva CJ, Weiss GE, Li S, Padilla C, Crompton PD, et al. Plasmodium falciparum malaria in the Peruvian Amazon, a region of low transmission, is associated with immunologic memory. *Infect Immun.* 2012;80(4):1583-92.

28. Branch OH, Takala S, Kariuki S, Nahlen BL, Kolczak M, Hawley W, et al. Plasmodium falciparum genotypes, low complexity of infection, and resistance to subsequent malaria in participants in the Asembo Bay Cohort Project. *Infect Immun.* 2001;69(12):7783-92.

29. Vásquez-Jiménez JM, Arévalo-Herrera M, Henao-Giraldo J, Molina-Gómez K, Arce-Plata M, Vallejo AF, et al. Consistent prevalence of asymptomatic infections in malaria endemic populations in Colombia over time. *Malar J.* 2016;15(1):70.

30. Vallejo AF, Chaparro PE, Benavides Y, Álvarez Á, Quintero JP, Padilla J, et al. High prevalence of sub-microscopic infections in Colombia. *Malar J.* 2015;14:201.

31. Cucunubá ZM, Guerra Á, Rivera JA, Nicholls RS. Comparison of asymptomatic Plasmodium spp. infection in two malaria-endemic Colombian locations. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2013;107(2):129-36.

32. Instituto Nacional de Salud (INS). Ministerio de Salud y Protección Social. Manual para el diagnóstico de malaria no complicada en puestos de diagnóstico y tratamiento. Milenio Editores, editor. Social Impresión 2015.



33. Chiang, C. L. 1984. *The Life Table and Its Applications* . Malabar, FL: Krieger.
34. Breslow N.E. (1992) Introduction to Kaplan and Meier (1958) Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. In: Kotz S., Johnson N.L. (eds) *Breakthroughs in Statistics. Springer Series in Statistics (Perspectives in Statistics)*. Springer, New York, NY.
35. Mantel N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother Rep.* 1966;50(3):163-70.
36. Harrington, D. P., and T. R. Fleming. 1982. A class of rank test procedures for censored survival data. *Biometrika* 69: 553–566.
37. Cox, D. R. 1972. Regression models and life-tables (with discussion). *Journal of the Royal Statistical Society, Series B* 34: 187–220
38. Cox, D. R., and E. J. Snell. 1968. A general definition of residuals (with discussion). *Journal of the Royal Statistical Society, Series B* 30: 248–275.
39. Camargo EP, Alves F, Pereira da Silva LH. Symptomless Plasmodium vivax infections in native Amazonians. *Lancet.* 1999;353(9162):1415-6.
40. Doolan DL, Dobaño C, Baird JK. Acquired immunity to malaria. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(1):13-36, Table of Contents.
41. Weiss GE, Traore B, Kayentao K, Ongoiba A, Doumbo S, Doumbo D, et al. The Plasmodium falciparum-specific human memory B cell compartment expands gradually with repeated malaria infections. *PLoS Pathog.* 2010;6(5):e1000912.
42. Drakeley CJ, Corran PH, Coleman PG, Tongren JE, McDonald SL, Carneiro I, et al. Estimating medium- and long-term trends in malaria transmission by using serological markers of malaria exposure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(14):5108-13.
43. Farrington L, Vance H, Rek J, Prahl M, Jagannathan P, Katureebe A, et al. Both inflammatory and regulatory cytokine responses to malaria are blunted with increasing age in highly exposed children. *Malar J.* 2017;16(1):499.

44. Portugal S, Moebius J, Skinner J, Doumbo S, Doumtabe D, Kone Y, et al. Exposure-dependent control of malaria-induced inflammation in children. *PLoS Pathog.* 2014;10(4):e1004079.
45. Moncunill G, Mayor A, Jimenez A, Nhabomba A, Puyol L, Manaca MN, et al. Cytokine and antibody responses to *Plasmodium falciparum* in naive individuals during a first malaria episode: effect of age and malaria exposure. *PLoS One.* 2013;8(2):e55756.
46. Achan J, Reuling I, Yap XZ, Dabira E, Ahmad A, Cox M, et al. Serologic markers of previous malaria exposure and functional antibodies inhibiting parasite growth are associated with parasite kinetics following a *Plasmodium falciparum* controlled human infection. *Clin Infect Dis.* 2019.

## **Capítulo 5.**

### **5. CONSIDERACIONES FINALES**

#### **5.1. Conclusiones generales**

Esta tesis doctoral, además de aportar nueva información sobre la problemática de las infecciones submicroscópicas en cuatro localidades del municipio de Tumaco, Nariño, permitió conocer la dinámica de estas infecciones en el tiempo y comprender algunos de los posibles factores involucrados en su persistencia.

El 9,1% (n=89) de los participantes del estudio presentaron infección afebril por *Plasmodium* spp., de estos, el 24,1% correspondían a infecciones microscópicas y el 75,9% a infecciones submicroscópicas. Estos resultados ponen en evidencia la magnitud de las infecciones por *Plasmodium* spp., en primer lugar las que no se están detectando por vigilancia pasiva de casos y en segundo lugar, las que aún en una búsqueda activa de casos no se podrían detectar dada la baja sensibilidad de las pruebas diagnósticas empleadas rutinariamente en los programas de vigilancia en el país (ML y PDRs).

La dimensión de este problema es aún mayor si adicionalmente se tiene en cuenta que el 44,7% de las infecciones submicroscópicas son portadoras de gametocitos. Nuestros resultados sugieren por lo tanto que las infecciones submicroscópicas en Tumaco pueden contribuir de manera importante a mantener la transmisión y podrían ser un obstáculo para la eliminación de la malaria en esta región si no se identifican.

Adicionalmente, en la fase longitudinal de este estudio, si bien se encontró que el 45,9% de los individuos con infección submicroscópica negativizaron la infección durante el período de estudio, el 32,8% permanecieron infectados hasta finalizar el seguimiento. Aunque en este estudio no se evaluó la gametocitemia durante los seguimientos, la proporción de individuos que albergan infecciones persistentes, podrían tener un mayor impacto en la transmisión dado que al no ser identificadas y tratadas por los programas de vigilancia, representan un reservorio constante de la infección.

Por otra parte, el presente trabajo encontró que la previa exposición con el parásito, reflejada en variables como tener un episodio previo de malaria durante el último año y el incremento en la edad, se asocia con

la posibilidad de estar infectado por *Plasmodium* spp. Si bien el 97,8% de las infecciones incluidas en el modelo GEE fueron afebriles y en su mayoría submicroscópicas (74,2%) no se puede afirmar con certeza que estos factores son propios de las infecciones submicroscópicas. Aunque en el modelo GEE en el que solo se incluyeron las infecciones submicroscópicas, la dirección de la asociación se conservó para estas variables (aunque no la significancia estadística), se requiere que futuros estudios evalúen los factores asociados a las infecciones submicroscópicas en comparación con las infecciones microscópicas febriles.

Una de las variables que puede reflejar la exposición previa al parásito son los niveles de IgG contra antígenos del *Plasmodium* spp. Si bien los niveles de anticuerpos no se pudieron incluir en el modelo GEE, debido a que estos niveles solo se midieron en una sub-muestra de los individuos no infectados, un hallazgo interesante del presente trabajo es que la gran mayoría de los individuos con infección submicroscópica, independiente de su auto-reporte de historia previa de malaria, fueron seropositivos a casi todos los anticuerpos evaluados. Si bien, una gran proporción de estos anticuerpos IgG probablemente sean producto de la infección actual, no se puede descartar que parte de estos anticuerpos provengan de episodios previos, probablemente que los individuos no recuerdan (sesgo de memoria).

En este mismo sentido, una mayor exposición previa al parásito parece estar relacionada con la persistencia de las infecciones submicroscópicas, encontrándose que hay una mayor persistencia de la infección en los individuos que tienen altos niveles de IgG anti *Plasmodium* en comparación con quienes presentan bajos niveles. Si bien estos hallazgos parecen ir en contravía de lo que se espera, que una respuesta inmune humoral efectiva permita el control y la consecuente eliminación del parásito, más que su persistencia, la tolerancia al parásito, la cual reduce el impacto negativo de la infección en las manifestaciones clínicas del hospedero al regular la respuesta pro-inflamatoria, sin afectar directamente el parásito, podrían ayudar a explicar la persistencia de estas infecciones, no obstante, se requiere de futuras investigaciones que evalúen el balance de las citoquinas inflamatorias y anti-inflamatorias en el curso de las infecciones submicroscópicas.

## 5.2. Sesgos y limitaciones

La selección de los 4 sitios de estudio se hizo por conveniencia con ayuda del personal de la Unidad de control vectorial (UCV) de Tumaco. Se seleccionaron lugares tanto del área urbana como rural que históricamente han sido endémicos para malaria. En cada uno de los lugares, áreas específicas de trabajo fueron delimitadas por el personal de la UCV en las cuales los auxiliares de campo tuvieran facilidad de acceso para la captación de toda la población que deseara participar en el estudio. Si bien los resultados encontrados en el presente trabajo no son representativos de toda de la población de Tumaco, las prevalencias reportadas en el presente trabajo son similares a las documentadas en estudios previos. Con respecto a la fase longitudinal, el conflicto social de la zona fue una de las dificultades que se tuvo que sortear, es por ello que algunos de los participantes no tienen todos sus seguimientos tal como se había diseñado desde el principio y varias de las pérdidas durante el seguimiento obedecieron a personas que por razones de seguridad, debieron mudarse a otras ciudades del país o incluso por fuera del país.

Aunque ninguno de los sujetos con infección submicroscópica reportó el haber consumido tratamiento antimalárico en los seguimientos realizados, no se puede excluir que quienes negativizaron la infección hayan consumido algún medicamento antimalárico para tratar la infección pues ellos sabían desde el ingreso al estudio su condición de infección submicroscópica.

Una de las principales hipótesis que se tenía al inicio del presente trabajo era que las infecciones submicroscópicas y su persistencia en el tiempo podría estar relacionada con los antecedentes previos de malaria. En este estudio se evaluaron dichos antecedentes preguntando a cada participante esta información. Este auto-reporte de malaria pudo generar un sesgo de memoria porque es probable que algunos de los sujetos no recuerden si tuvieron malaria alguna vez en su vida o el número de episodios. Sin embargo este sesgo sería no diferencial entre los participantes que persistieron y negativizaron puesto que las variables se evaluaron al ingreso del estudio antes de conocer el desenlace.

LAMP-pan y LAMP-Pf tienen la capacidad de detectar 5 y 7.5 copias de ADN del parásito respectivamente, las cuales son equivalentes a una parasitemia de 1 parásito/ $\mu$ L de sangre (1). Además de su buena sensibilidad, LAMP es una prueba fácil de implementar, no requiere

equipos sofisticados ni personal altamente entrenado, lo que es ideal en el marco de un programa de vigilancia. Pese a esto, LAMP es una prueba subjetiva en la que no es posible conocer las parasitemias ni como estas fluctúan en el tiempo. Además, actualmente existen pruebas moleculares ultrasensibles que tienen un límite de detección mucho más bajo que LAMP (2), por lo que es posible que en algunos casos, se haya reportado muestras como negativas cuando en realidad tenían parasitemias por debajo de su límite de detección. Teniendo en cuenta lo anterior, en la definición del desenlace evaluado (negativización de la infección) se pudo haber presentado un sesgo de clasificación debido a que las parasitemias por *Plasmodium* spp. pueden variar en el tiempo, incluso casi a niveles indetectables. Tratando de superar esta dificultad, la definición de la negativización de la infección en este estudio contempló que un mismo participante tuviera al menos tres mediciones negativas consecutivas para definir la presentación del evento.

Si bien se intentó hacer genotipificación del parásito para evaluar si en los individuos clasificados con infección persistente, un mismo genotipo del parásito estuvo presente a lo largo del seguimiento, las bajas parasitemias impidieron tener resultados para la mayoría de las muestras evaluadas, esta misma dificultad ha sido reportada en previos estudios. No obstante, el hecho de que Tumaco, Nariño, es considerado un área de baja endemia para malaria, la posibilidad de una nueva reinfección en un periodo de 10 semanas es poco probable.

Con respecto a la definición de persistencia, dado el diseño del estudio, no fue posible conocer el momento exacto en el que los individuos con infección submicroscópica adquirieron la infección, estos tiempos puede variar entre los participantes y sesgar los resultados. No sabemos si aquellos participantes que negativizaron la infección, llevan más tiempo infectados que aquellos que persistieron. A pesar de esto, nuestros resultados muestran que una importante proporción de infecciones submicroscópicas persisten al menos por 10 semanas lo cual representa un obstáculo para la eliminación de la malaria en esta región si no se identifican estos reservorios de infección. Si bien un escenario ideal es seguir individuos no infectados para conocer el momento exacto de la infección y partir de ahí, estimar el tiempo de persistencia, limitaciones en cuantos costos, complejidad y logística del trabajo de campo, son factores que dificultan la implementación de este tipo de estudios en nuestro medio.

Si bien en la fase transversal del estudio se captaron los 66 individuos para el análisis de persistencia, el porcentaje de pérdidas durante el seguimiento fue mayor del calculado (27,3%), este hecho probablemente afectó la precisión de los intervalos de confianza en la estimación de la medida de asociación. Adicionalmente, dado que se desarrollaron 28 eventos durante el seguimiento (negativización de la infección) y siguiendo la recomendación de incluir en los modelos de riesgos proporcionales de Cox una covariable por cada 10 eventos (3, 4), los modelos expuestos en el presente trabajo solo incluyeron una variable de interés más la variable de ajuste (edad) para conservar la parsimonia del modelo. No obstante, teniendo en cuenta que probablemente la persistencia de las infecciones submicroscópicas es un fenómeno multicausal, es necesario tener un tamaño de muestra mayor que permita incluir en los modelos, otras posibles variables que por plausibilidad biológica puedan explicar el fenómeno de interés y a su vez mejorar la precisión de los intervalos de confianza.

El desarrollo de malaria en los participantes del estudio puede ser considerado un riesgo que compite con el evento de interés (5) (negativización de la infección) en el análisis de persistencia, esto debido a que los participantes debieron ser tratados antes de desarrollar el evento o de finalizar el seguimiento. No obstante, debido a que solo dos de los participantes con infección submicroscópica desarrollaron malaria, estas observaciones fueron censuradas al momento de presentarse el evento que compite.

La ausencia de un grupo de personas infectadas sintomáticas en la fase transversal no nos permite saber con exactitud si existen diferencias en los niveles de anticuerpos según la presencia de síntomas y la parasitemia, lo que nos podría ayudar a definir si existe una respuesta diferencial de anticuerpos entre los diferentes grupos de infección (microscópica sintomática, microscópica asintomática y submicroscópica).

Por cuestiones logísticas no fue posible obtener muestra para la extracción de RNA de gametocitos en todos los individuos con infección submicroscópicas (47/66). Además el hecho de haber colectado la muestra en papel de filtro 903 sin preservante pudo haber afectado la recuperación de ARN y por consecuencia haber subestimado la proporción de portadores de gametocitos. Aun así, la proporción de gametocitos

identificada en este estudio da cuenta del posible rol de estas infecciones en la transmisión.

Dada la complejidad y costos que implica un trabajo de este tipo en nuestro medio, los hallazgos reportados en esta tesis doctoral, aún con las limitaciones expuestas previamente, ayudan a direccionar futuros estudios en la búsqueda de los factores relacionados con la persistencia de las infecciones submicroscópicas

### **5.3. Contextualización de los resultados**

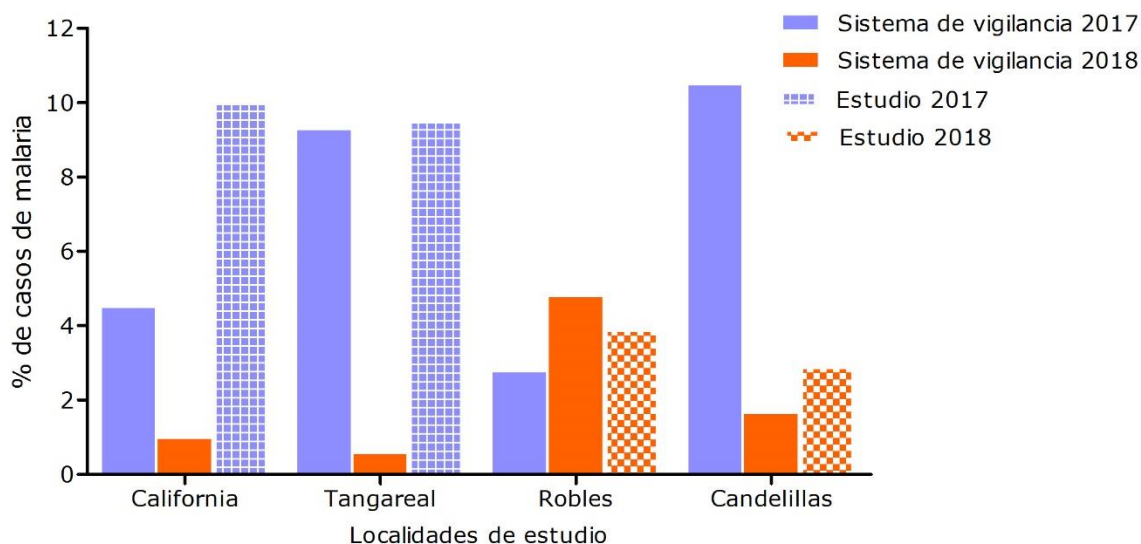
La dinámica de transmisión de la malaria es compleja e involucra factores climáticos, del comportamiento del vector y del humano, entre otros (6). Un adecuado control de la malaria por tanto, debe incidir en dichos factores (7) y para ello se requiere conocer el comportamiento, no solo de las infecciones microscópicas, sino además submicroscópicas en los distintos entornos endémicos, identificar su rol en la transmisión y hacer una caracterización del vector, el parásito y el ambiente en el que se presentan estas infecciones.

En general, Colombia es una zona de transmisión baja e inestable pero existen zonas de alta transmisión ( $IPA > 10$ ) como la Región Pacífica. Esta heterogeneidad en la transmisión debe ser tenida en cuenta al momento de orientar las políticas de control y eliminación de la malaria, por lo que es fundamental hacer una caracterización en las distintas zonas endémicas del país (8, 9). En un estudio conducido en la costa Pacífica caucana por ejemplo, al analizar las prevalencias de infección subclínica y asintomática en dos localidades diferentes, se encontró que en la localidad El Cuerval (Timbiquí) había una correlación con el comportamiento de la malaria en el mismo año, esto es, hubo una disminución de los casos informados al sistema de vigilancia epidemiológica que coincidió a su vez con una baja prevalencia de la infección subclínica y asintomática. Por el contrario, en Santa Mónica (Guapi), la disminución en la proporción de casos de infección subclínica y asintomática se relacionó con un aumento de casos informados al sistema de vigilancia epidemiológica. Dichos resultados sugieren que otros factores como la movilidad humana, la actividad económica entre otros factores están involucrados en la dinámica de la transmisión (7).

De manera similar a lo que ocurre en el departamento de Nariño, al interior del municipio de Tumaco, existen localidades en las que se



concentran los casos de malaria. Las 4 localidades seleccionadas en este estudio aportaron el 21,6% y 7,89% de los casos de Tumaco en 2017 y 2018 respectivamente (Datos proporcionados por la UCV en Tumaco). Sin embargo, de estas veredas, para el 2017, Candelillas y Tangareal reportaron el mayor número de casos al sistema de vigilancia, mientras que para el 2018 fue Robles, que en 2017 había sido la localidad que menor número de casos había reportado (Figura C5.1). De manera interesante se puede observar que el mayor número de casos reportados al sistema de vigilancia corresponde a su vez con la mayor proporción de infecciones submicroscópicas reportadas en este estudio (el muestreo en California y Tangareal se hizo en 2017; en Robles, entre 2017 y 2018; y en Candelillas, en 2018 (Sup C5.1).



**Figura C5.1.** Proporción de casos de malaria con respecto al total de casos en Tumaco reportados en el sistema de vigilancia (Barras solidas) y proporción de infecciones submicroscópicas detectadas en el estudio (Barras con patrón de cuadros)

Estos resultados son similares a lo encontrado en El Cuerval en la costa Pacífica Caucana (7) en el que la prevalencia de los casos de infección submicroscópica se relaciona con la prevalencia de casos reportados al sistema de vigilancia, y muestran a su vez que en esta región hay una transmisión espacio-temporal heterogénea. Estos hallazgos sugieren que la identificación de las infecciones a nivel micro epidemiológico es necesaria en los diferentes contextos endémicos para dirigir de manera apropiada las medidas de control de la malaria.

Finalmente, como ya ha sido reportado antes Padilla *et al.* (2015) y mostrado nuevamente en este estudio, en Tumaco hay transmisión urbana y peri-urbana de la malaria (11), lo cual debe ser considerada al momento de la implementación de las estrategias para su control, lo anterior porque se ha documentado que las áreas urbanas muestran diferentes riesgos de exposición en comparación con las áreas rurales y ofrecen mejores oportunidades para la prevención y el control oportuno de la malaria debido a la infraestructura existente, las capacidades tecnológicas y el acceso a los servicios de salud (11-13). No obstante, la definición de las áreas urbanas y periurbanas ha sido un desafío en Colombia dado que el concepto de lo urbano y periurbano se define en función de factores administrativos que no necesariamente tienen en cuenta la ecología, es decir, la presencia de recolección de agua, criaderos de mosquitos, arbustos y otras condiciones más rurales (11).

La delimitación de estas áreas ha sido un reto en Tumaco ya que en los últimos años se han construido en el área delimitada como urbana, barrios de invasión donde una gran proporción de viviendas han sido construidas sobre manglares con maderas de baja calidad y con condiciones técnicas de construcción inadecuadas, las cuales, además de no brindar mayores condiciones de seguridad ante posibles eventos naturales o en situaciones antrópicas que puedan presentarse, contribuyen con la introducción y mantenimiento de enfermedades transmisibles como la malaria (14). La zonas del Barrio California y Tangareal donde se hizo el muestro son consideradas zonas de invasión que si bien administrativamente son consideradas del área urbana y periurbana, tienen condiciones propias que favorecen la transmisión de la infección y deben ser tenidas en cuenta a la hora de la implementación de actividades de vigilancia y control.

#### **5.4. Importancia de los resultados a la luz de los programas de eliminación**

Diferentes estrategias para eliminar y erradicar la malaria se han implementado a lo largo de la historia con las cuales se han logrado progresos importantes en el control de la enfermedad, como la disminución de las tasas de incidencia y mortalidad en los últimos años, y la entrada de varios países en fase de eliminación. No obstante, pese a dichos esfuerzos, la malaria continúa siendo una de las enfermedades infecciosas más importantes en salud pública a nivel mundial, reflejando, que aún hay aspectos que se desconocen o no se han tenido en cuenta en el contexto de la implementación de los programas de eliminación.

Los resultados de este proyecto están en concordancia con lo propuesto en la estrategia técnica mundial 2016-2030. Dicha estrategia señala la necesidad de conducir investigaciones que permitan definir los entornos que deben ser intervenidos para lograr una reducción de la transmisión de la infección (15). Esta tesis se enfocó en la identificación de las infecciones submicroscópicas afebriles por *Plasmodium* spp. como potencial reservorio de transmisión, que representan una de las barreras para el logro de los objetivos de los programas de eliminación de la malaria. Además de la identificación de estos reservorios en diferentes localidades en el municipio de Tumaco, este trabajo reveló que una importante proporción de estas infecciones pueden persistir en el tiempo, alternando en algunos casos entre parasitemias submicroscópicas y microscópicas, sin necesariamente desarrollar un episodio malárico, sugiriendo con mayor certeza, que estas infecciones pueden mantener activos los focos de transmisión.

Uno de los principales objetivos de la agenda actual para la eliminación de la malaria es la disponibilidad de herramientas altamente sensibles que puedan ser realizadas en campo para la detección de portadores asintomáticos. En este sentido, la prueba LAMP constituye una prometedora estrategia de diagnóstico molecular, ya puede detectar parasitemias de baja densidad (1 parásito/uL) (1) y no requiere equipamiento especializado, lo que la convierte en una prueba potencialmente aplicable en los programas de vigilancia, cuando el interés es identificar todos los focos de transmisión (16). Si bien se sabe que existen PCR más sensibles que LAMP, capaces de detectar densidades extremadamente bajas de parásitos, su utilidad en los programas de control de la malaria no es claro aún puesto que el impacto potencial de estas ultra bajas parasitemias en la transmisión aún no se han dilucidado (17), además, la implementación de estas técnicas en campo, no serían de fácil aplicabilidad.

Si bien la estrategia de mejorar y optimizar el control de vectores y el manejo de casos de malaria es fundamental para mantener el acceso continuo a los servicios básicos de atención, como se propone en los planes nacionales, también es necesario implementar planes de vigilancia para detectar, caracterizar y vigilar todos los casos tanto individuales como de focos (18, 19). Dado que en Colombia se ha venido incrementando el número de casos de malaria, principalmente en la costa Pacífica colombiana pese a las actividades de vigilancia y control implementadas, y teniendo en cuenta los hallazgos de esta tesis, al igual

que otros trabajos que han demostrado la importancia de las infecciones submicroscópicas y asintomáticas para la transmisión de la infección, es necesario que en Colombia se implementen estrategias encaminadas a la detección de estas infecciones en los programas de vigilancia, para poder implementar medidas efectivas de control y eliminación que permita el logro de los objetivos propuestos de manera progresiva y sostenida.

Si bien la estrategia de detección activa de casos empleando métodos más sensibles que la microscopia podría ayudar a identificar una mayor proporción de reservorios de infección, el impacto del tratamiento de estas infecciones en la disminución de la incidencia de la enfermedad, debe ser evaluada en nuestro contexto. Cook et. al., 2015, reportaron que en comunidades de Tanzania, donde hay circulación de infecciones de alta y baja densidad (detectadas por PCR), el tratamiento solo en quienes tienen infecciones positivas por PDR, no reduce la incidencia de malaria (20). Por su parte, el tratamiento de las infecciones microscópicas asintomáticas en niños menores de 5 años en una localidad en Burkina Faso tampoco tuvo un impacto importante en la disminución de la incidencia de la malaria (21). Resultados similares fueron reportados por Halliday et.al (2013) en Kenia (22). Todo lo anterior sugiere que la transmisión sostenida de la malaria podría en parte ser explicada por que no todos los reservorios de infección fueron tratados, soportando la idea que estas infecciones son importantes para mantener activa la transmisión (23).

Pese a la evidencia soportada en previos estudios, se requiere el diseño de futuras investigaciones en nuestro medio, principalmente en las localidades donde se han caracterizados los focos de infección, para evaluar el impacto del tratamiento antimalárico en todos los reservorios de infección (microscópicos y submicroscópicos, sintomáticos y asintomáticos). Futuros estudios en nuestro medio también deberían enfocarse en evaluar la factibilidad del empleo de NAAT en los programas de vigilancia, desde la recolección y el transporte de muestras desde el campo hacia los laboratorios, hasta los costos y el tiempo de respuesta. Todo ello para evaluar si este tipo de estrategias son oportunas y costo-efectivas en nuestro medio.

Por último, considerando la importancia que reviste la identificación de los factores involucrados en la dinámica de transmisión de las infecciones por *Plasmodium* spp., esta tesis identificó que la exposición previa al parásito, se asoció con mayor persistencia de las infecciones

submicroscópicas en el tiempo. Lo anterior sugiere que la serovigilancia en malaria podría ser útil no solo como un marcador para monitorear el nivel de exposición, sino además, para identificar poblaciones que probablemente tengan reservorios de infección submicroscópicas persistentes. No obstante, dado que estos hallazgos son aún incipientes, se requiere el diseño de futuros estudios destinados a reafirmar estos hallazgos y a identificar los mejores biomarcadores de exposición para tal fin.

En resumen, los resultados de este trabajo señalan aspectos desde lo biológico que permiten conocer un poco más la problemática de las infecciones submicroscópicas en el país, lo cual podría ayudar a dirigir medidas de vigilancia y control de la malaria que permitan en turno, aproximarnos a un escenario de eliminación. No obstante, se reconoce que la malaria es una enfermedad compleja, en la que intervienen aspectos biológicos del individuo, del parásito y del vector, y además, aspectos sociales, económicos, políticos y culturales de los contextos propios donde se presenta la enfermedad. En un escenario ideal estos aspectos debieran ser abordados en conjunto, para conocer la dinámica de la transmisión de la enfermedad. Para ello es claro que más allá de combatir las causas de la enfermedad desde lo biológico y lo social, hay que comprender que sus relaciones no son lineales sino que hay giros y transiciones que deben ser considerados para entender la malaria en todo su contexto, pues aunque una enfermedad tenga frecuencias similares en territorios diferentes, sus procesos explicativos son distintos y también, lo son sus posibilidades de intervención (24).

La jerarquización de las áreas a intervenir en malaria podría permitir planear objetivos y metas más reales, identificar posibles alternativas específicas y costo efectivas de intervención orientados a reducir o eliminar los factores subyacentes, a través de medidas de promoción, prevención y control y para monitorear y evaluar los efectos a corto y largo plazo en la transmisión de la enfermedad. El éxito de un programa de eliminación de la malaria depende de tener las herramientas adecuadas y del soporte de los gobiernos para su disponibilidad. Si bien el conocimiento científico es fundamental pues permite conocer los factores subyacentes a la enfermedad, también lo es el compromiso político para lograr una financiación estable y previsible de los programas que se implementen.

Perspectivas

Los resultados de esta tesis doctoral evidencian no solo que existe un reservorio de infección por *Plasmodium spp.* que no se está detectando en los programas de vigilancia del país, sino que además, este reservorio tiene la capacidad de persistir en el tiempo y mantener activa la transmisión dificultando el éxito de los programas de control de la enfermedad. A la luz de estos hallazgos, es necesario que el sistema de vigilancia implemente pruebas diagnósticas más sensibles y a su vez fáciles de implementar en campo para la identificación y control de estas infecciones. Esta búsqueda de reservorios se debe hacer en todas las áreas endémicas para malaria en el país y en diferentes momentos en el tiempo con el fin de identificar estos focos de infección de una manera más estricta, que permita orientar los esfuerzos de control en los lugares donde realmente se requiera.

En el capítulo uno de este manuscrito se señaló que los resultados obtenidos en este trabajo podrían ayudar a orientar la discusión de la pertinencia de tratar o no las infecciones submicroscópicas. Si bien, este no fue el principal objetivo de esta tesis, la alta proporción de individuos con infecciones submicroscópicas persistentes portadores de gametocitos (al menos al inicio de estudio) sugiere que estas infecciones al no ser tratadas son un reservorio infeccioso que impide el logro de los objetivos de la eliminación propuestos por la OMS. Aunque en este trabajo se encontró que la inmunidad humoral está estrechamente relacionada con la persistencia de las infecciones submicroscópicas, si el objetivo es eliminar la malaria, el tratamiento de estas infecciones es necesario aun cuando esto implique inevitablemente que la inmunidad protectora se pueda perder. Eso sí, el esfuerzo de los programas de eliminación debe ser sostenido en el tiempo, de otra manera, si el parásito no se elimina de las áreas endémicas, la pérdida de la inmunidad podría predisponer a la población expuesta a diferentes complicaciones de la malaria.

Con los resultados obtenidos en la presente investigación, se requiere profundizar más sobre el fenómeno de la persistencia de las infecciones submicroscópicas en futuras investigaciones que permitan: a) evaluar si el fenómeno de tolerancia puede explicar la persistencia de las infecciones submicroscópicas, b) estimar la dinámica de los niveles de anticuerpos en el curso de las infecciones submicroscópicas para saber si existen variaciones en la respuesta inmune entre quienes persisten y negativizan la infección, c) evaluar el comportamiento en el tiempo de las gametocitemias y de los anticuerpos en individuos con infecciones submicroscópicas, d) explorar si algunos genes de la respuesta inmune

están asociados con la persistencia de estas infecciones, e) identificar si existen genotipos del parásito específicamente asociados a las infecciones submicroscópicas y al fenómeno de persistencia.

En resumen, dada la importancia que revisten las infecciones submicroscópicas actualmente no solo en Colombia sino en el mundo, es necesario continuar aunando esfuerzos que permitan esclarecer el panorama de la dinámica de las infecciones submicroscópicas por *Plasmodium spp.*

## 5.5. Referencias

1. The Foundation for Innovative New Diagnostics (FIND). Manual of standard operating procedures for malaria LAMP. Geneva; 2012. <https://www.fnndx.org/wp-content/uploads/2016/04/SOP-LAMP-Malaria-Aug2012.pdf> . Accessed April 2016.
2. Imwong M, Hanchana S, Malleret B, Rénia L, Day NP, Dondorp A, et al. High-throughput ultrasensitive molecular techniques for quantifying low-density malaria parasitemias. *J Clin Microbiol.* 2014;52(9):3303-9.
3. Concato J, Peduzzi P, Holford TR, Feinstein AR. Importance of events per independent variable in proportional hazards analysis. I. Background, goals, and general strategy. *J Clin Epidemiol.* 1995;48(12):1495-501.
4. Peduzzi P, Concato J, Feinstein AR, Holford TR. Importance of events per independent variable in proportional hazards regression analysis. II. Accuracy and precision of regression estimates. *J Clin Epidemiol.* 1995;48(12):1503-10.
5. Fine JP, Gray RJ. A proportional hazards model for the subdistribution of a competing risk. *J Am Stat Assoc.* 1999;94:496-509.
6. Laishram DD, Sutton PL, Nanda N, Sharma VL, Sobti RC, Carlton JM, et al. The complexities of malaria disease manifestations with a focus on asymptomatic malaria. *Malar J.* 2012;11:29.
7. Knudson R. La vigilancia de la malaria asintomática y su contribución al programa de eliminación de la malaria en Guapi-Cauca, Colombia. Bogotá: Universidad Nacional; 2019.

8. Sturrock HJ, Hsiang MS, Cohen JM, Smith DL, Greenhouse B, Bousema T, et al. Targeting asymptomatic malaria infections: active surveillance in control and elimination. *Plos Med.* 2013;10(6):e1001467.
9. Mosha JF, Sturrock HJ, Greenhouse B, Greenwood B, Sutherland CJ, Gadalla N, et al. Epidemiology of subpatent *Plasmodium falciparum* infection: implications for detection of hotspots with imperfect diagnostics. *Malar J.* 2013;12:221.
10. Instituto Departamental de Salud de Nariño. Informe ENOS por Municipio y Departamento, años 2008 a 2018 [Available from: <http://www.idsn.gov.co/index.php/subdireccion-de-salud-publica/epidemiologia/429-eventos-de-notificacion-enos>].
11. Padilla JC, Chaparro PE, Molina K, Arevalo-Herrera M, Herrera S. Is there malaria transmission in urban settings in Colombia? *Malar J.* 2015;14:453.
12. Caldas de Castro M, Yamagata Y, Mtasiwa D, Tanner M, Utzinger J, Keiser J, et al. Integrated urban malaria control: a case study in dar es salaam, Tanzania. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;71(2 Suppl):103-17.
13. Siri JG, Lindblade KA, Rosen DH, Onyango B, Vulule J, Slutsker L, et al. Quantitative urban classification for malaria epidemiology in sub-Saharan Africa. *Malar J.* 2008;7:34.
14. Rivera-Cortés J, Colorado-Marquines C. Análisis de la situación de Salud con el modelo de los determinantes sociales ASIS. Alcaldía Municipal de Tumaco, Secretaría de Salud. 2018.
15. OMS. Estrategia Técnica Mundial contra la malaria 2016-2030. Programa Mundial sobre Paludismo Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2105 [Available from: [http://www.who.int/malaria/areas/global\\_technical\\_strategy/es/](http://www.who.int/malaria/areas/global_technical_strategy/es/)].
16. Serra-Casas E, Guetens P, Chiheb D, Gamboa D, Rosanas-Urgell A. A pilot evaluation of alternative procedures to simplify LAMP-based malaria diagnosis in field conditions. *Acta Trop.* 2019;200:105125.
17. Hofmann NE, Gruenberg M, Nate E, Ura A, Rodriguez-Rodriguez D, Salib M, et al. Assessment of ultra-sensitive malaria diagnosis versus standard molecular diagnostics for malaria elimination: an in-depth molecular community cross-sectional study. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(10):1108-16.



18. World Health Organization . (2017). A framework for malaria elimination. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/254761> . Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

19. Ministerio de Salud y Protección Social. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Estrategia de Gestión Integrada (EGI) para la promoción, prevención y control de las Enfermedades Transmitidas por Vectores en Colombia, 2012 – 2021. Bogotá, 2014.

20. Cook J, Xu W, Msellem M, Vonk M, Bergstrom B, Gosling R, et al. Mass screening and treatment on the basis of results of a Plasmodium falciparum-specific rapid diagnostic test did not reduce malaria incidence in Zanzibar. *J Infect Dis.* 2015;211(9):1476-83.

21. Tiono AB, Ouedraogo A, Ogutu B, Diarra A, Coulibaly S, Gansane A, et al. A controlled, parallel, cluster-randomized trial of community-wide screening and treatment of asymptomatic carriers of Plasmodium falciparum in Burkina Faso. *Malar J.* 2013;12:79.

22. Halliday KE, Okello G, Turner EL, Njagi K, mcharo C, Kengo J, et al. Impact of intermittent screening and treatment for malaria among school children in Kenya: a cluster randomised trial. *Plos Med.* 2014;11(1):e1001594.

23. Von Seidlein L, Walraven G, Milligan PJ, Alexander N, Manneh F, Deen JL, et al. The effect of mass administration of sulfadoxine-pyrimethamine combined with artesunate on malaria incidence: a double-blind, community-randomized, placebo-controlled trial in The Gambia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2003;97(2):217-25.

24. Piñeros J. Malaria y determinantes sociales de la salud: un nuevo marco heurístico desde la medicina social latinoamericana. *Biomédica.* 2010;30:178-87.

### Información suplementaria

**Sup C3.1.** ΔDO de los anticuerpos IgG evaluados en 36 residentes norteamericanos sin exposición a *Plasmodium* spp. en toda la vida y puntos de corte de seropositividad

Muestra	ΔDO* de Anticuerpos			
	Pf-MSP1	Pf-AMA1	Pv-MSP1	Pv-121
1	0,134	0,183	0,057	0,069
2	0,198	0,801	0,106	0,114
3	0,160	0,615	0,098	0,102
4	0,184	0,432	0,084	0,081
5	0,124	0,281	0,051	0,062
6	0,213	0,213	0,081	0,082
7	0,221	0,347	0,096	0,080
8	0,109	0,521	0,064	0,047
9	0,096	0,311	0,057	0,042
10	0,092	0,203	0,061	0,055
11	0,128	0,351	0,073	0,044
12	0,083	0,539	0,080	0,049
13	0,077	0,415	0,028	0,035
14	0,105	0,261	0,053	0,078
15	0,223	0,397	0,062	0,084
16	0,187	0,872	0,080	0,085
17	0,123	0,452	0,061	0,077
18	0,122	0,223	0,044	0,064
19	0,092	0,863	0,049	0,044
20	0,215	0,297	0,086	0,044
21	0,129	0,680	0,155	0,065
22	0,066	0,386	0,053	0,037
23	0,114	0,566	0,106	0,076
24	0,082	0,395	0,076	0,079
25	0,069	0,276	0,024	0,035
26	0,103	0,352	0,054	0,052
27	0,112	0,394	0,047	0,058
28	0,067	0,187	0,023	0,040
29	0,124	0,070	0,020	0,025

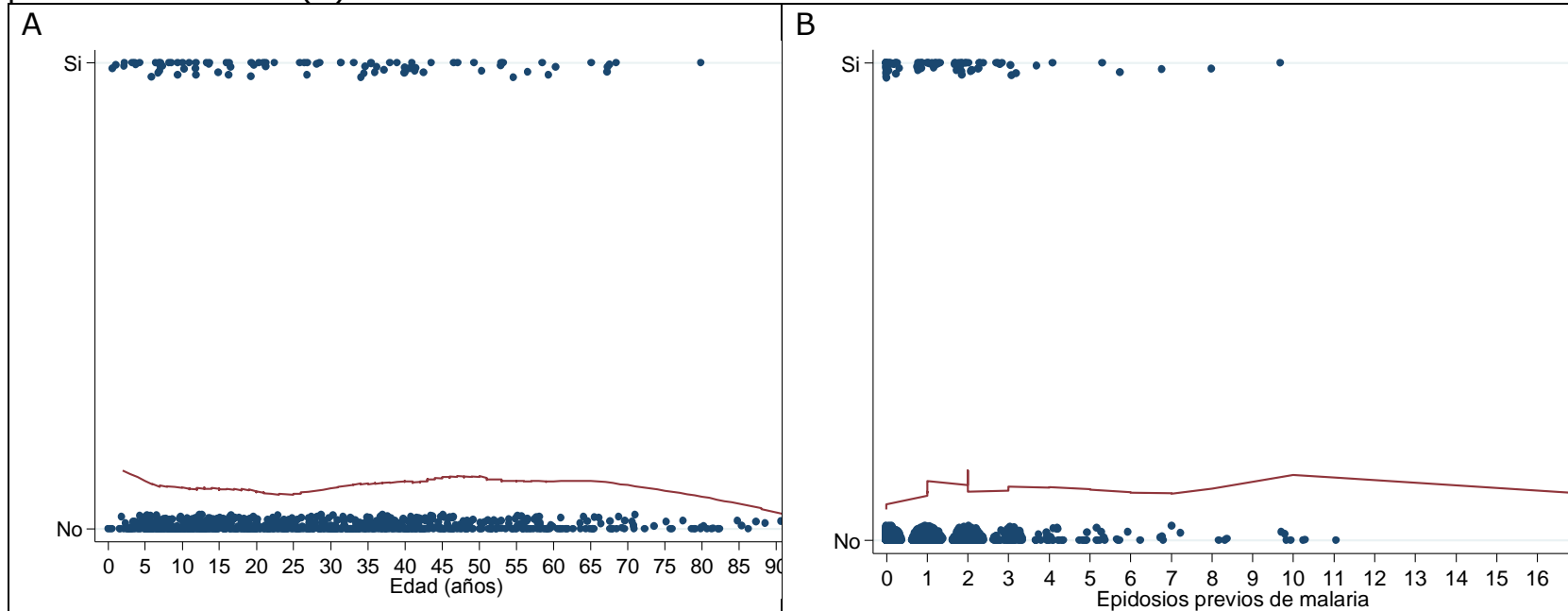
Continuación Sup. C3.1

Muestra	$\Delta DO^*$ de Anticuerpos			
	Pf-MSP1	Pf-AMA1	Pv-MSP1	Pv-121
30	0,105	0,324	0,037	0,040
31	0,097	0,286	0,106	0,048
32	0,048	0,409	0,044	0,026
33	0,109	0,476	0,096	0,052
34	0,066	0,215	0,055	0,045
35	0,124	0,416	0,097	0,069
36	0,097	0,257	0,096	0,030
Media del nivel de IgG	0,122	0,396	0,068	0,059
Desviación estándar	0,048	0,189	0,029	0,022
Punto de corte seropositividad (Media +3DE)	0,266	0,963	0,155	0,124
Muestras submicroscópicas negativas* n (%)	3 (4,55)	66 (100)	10 (15,15)	20 (30,30)
Muestras submicroscópicas positivas† n (%)	63 (95,45)	0	56 (84,85)	46 (69,70)

$\Delta DO^*$ :  $\Delta$  de la Densidad óptica.

55,56% de estos individuos fueron mujeres (20/36) y la mediana de la edad fue de 36 años (RI=27-54).

**Sup C3.2.** Valoración del supuesto de linealidad de las variables cuantitativas Edad (A) y episodios previos de malaria (B)



**Sup C3.3** Asociación entre las características del individuo y la vivienda con todas las infecciones afebriles por *Plasmodium* spp (Microscópicas y submicroscópicas).

Característica	Infectados				PR cruda*		PR ajustada†	
	No	Si	PR	IC 95%	PR	IC 95%		
<b>Individuo</b>								
<b>Sexo n (%)</b>								
Mujer	550	92,0	48	8,0	1 <sup>‡</sup>		1	
Hombre	319	89,9	36	10,1	1,25	0,82 - 1,91	1,36	0,78 - 2,37
<b>Lugar de ocupación, n (%)</b>								
Interior	334	91,3	32	8,7	1		1	
Exterior	487	91,0	48	9,0	1,09	0,70 - 1,70	1,28	0,79 - 2,08
<b>Edad, años; mediana(RI)</b>								
<6; n (%)	63	88,7	8	11,3	1		1	
6-15; n (%)	237	91,9	21	8,1	0,78	0,33 - 1,80	0,59	0,23 - 1,52
16-25; n (%)	142	92,8	11	7,2	0,63	0,24 - 1,62	0,63	0,22 - 1,77
> 25; n (%)	427	90,7	44	9,3	0,98	0,45 - 2,14	0,98	0,39 - 2,48
<b>Malaria previa, n (%)</b>								
No; n (%)	412	93,4	29	6,6	1		1	
Si; n (%)	457	89,3	55	10,7	1,54	0,98 - 2,43	1,49	0,91 - 2,46
<b>Episodios malaria, episodios; mediana (RI)</b>								
0 n (%)	412	93,4	29	6,6	1		1	
1 n (%)	197	90,4	21	9,6	1,45	0,83 - 2,53	1,39	0,77 - 2,52
>1 n (%)	253	88,2	34	11,9	1,67	1,00 - 2,79	1,65	0,94 - 2,92
<b>Malaria el último año; n (%)</b>								
No	704	92,6	56	7,4	1		1	
Si	161	85,2	28	14,8	<b>1,67</b>	<b>1,02 - 2,71</b>	<b>1,72</b>	<b>1,04 - 2,83</b>

Continuación **Sup C3.3.**

Característica	Infectados				PR cruda*			PR ajustada†		
	No	Si	PR	IC 95%	PR	IC 95%	PR	IC 95%		
<b>Vivienda</b>										
<b>Lugar; n (%)</b>										
Candelillas	199	97,1	6	2,9	1			1		
Robles	221	95,7	10	4,3	1,47	0,43 - 4,94	1,29	0,38 - 4,35		
Tangareal	196	85,6	33	14,4	<b>4,73</b>	<b>1,68 - 13,31</b>	<b>4,44</b>	<b>1,58 - 12,42</b>		
California	253	87,9	35	12,2	<b>4,31</b>	<b>1,55 - 12,01</b>	<b>3,80</b>	<b>1,36 - 10,57</b>		
<b>Habitantes por vivienda; n (%)</b>										
1 - 4	390	91,3	37	8,7	1		1			
≥5	469	90,9	47	9,1	1,03	0,61 - 1,73	1,17	0,69 - 1,99		
<b>Animales en la vivienda; n (%)</b>										
No	278	92,1	24	8,0	1		1			
Si	580	90,8	59	9,2	1,27	0,70 - 2,30	1,27	0,70 - 2,32		
<b>Servicio de electricidad, n (%)</b>										
Si	841	91,1	82	8,9	1		1			
No	5	83,3	1	16,7	1,68	0,17 - 16,59	1,68	0,17 - 16,65		
<b>Servicio de acueducto, n (%)</b>										
Si	407	92,7	32	7,3	1		1			
No	444	89,9	50	10,1	1,35	0,79 - 2,29	1,3	0,75 - 2,19		

\*Razón de prevalencia cruda, †Razón de prevalencia Ajustada por ocupación y edad, ‡Categoría de referencia

**Sup C3.4** Asociación entre las características del individuo y la vivienda con todas las infecciones submicroscópicas por *Plasmodium* spp.

Característica	Infectados				PR cruda*		PR ajustada†	
	No	Si	PR	IC 95%	PR	IC 95%		
<b>Individuo</b>								
<b>Sexo</b> n (%)								
Mujer	550	93,7	37	6,3	1#		1	
Hombre	319	91,7	29	8,3	1,30	0,80 - 2,11	1,30	0,71 - 2,38
<b>Lugar de ocupación,</b> n (%)								
Interior	334	93,3	24	6,7	1		1	
Exterior	487	92,4	40	7,6	1,19	0,72 - 1,98	1,33	0,76 - 2,32
<b>Edad, años;</b> mediana(RI)								
<6; n (%)	25,0	(11-41)	25,0	(11-40)			1,01	0,99 - 1,02
6-15; n (%)	63	91,3	6	8,7	1		1	
16-25; n (%)	237	93,3	17	6,7	0,74	0,29 - 1,90	0,58	0,21 - 1,62
> 25; n (%)	142	94,0	9	6,0	0,66	0,23 - 1,86	0,65	0,21 - 2,00
<b>Malaria previa,</b> n (%)								
No	427	92,6	34	7,4	0,88	0,37 - 2,09	0,90	0,33 - 2,49
Si	412	94,3	25	5,7	1		1	
Si	457	91,8	41	8,2	1,40	0,85 - 2,32	1,38	2,37 - 2,38
<b>Episodios malaria, episodios;</b> mediana (RI)								
0 n (%)	1	(0-2)	1	(0-2)				-
1 n (%)	412	94,3	25	5,7	1		1	
>1 n (%)	197	90,8	20	9,2	1,60	0,89 - 2,88	1,52	0,82 - 2,82
>1 n (%)	253	92,3	21	7,7	1,29	0,71 - 2,33	1,29	0,68 - 2,46
<b>Malaria el último año;</b> n (%)								
No	704	93,5	49	6,5	1		1	
Si	161	90,5	17	9,6	1,36	0,77 - 2,41	1,41	0,79 - 2,52

Continuación **Sup C3.4.**

Característica	Infectados				PR cruda*			PR ajustada†		
	No	Si	PR	IC 95%	PR	IC 95%	PR	IC 95%		
<b>Vivienda</b>										
<b>Lugar; n (%)</b>										
Candelillas	199	97,1	6	2,9	1			1		
Robles	221	96,1	9	3,9	1,26	0,38 - 4,22	1,10	0,32 - 3,79		
Tangareal	196	89,9	22	10,1	<b>3,52</b>	<b>1,26 - 9,82</b>	<b>3,39</b>	<b>1,20 - 9,56</b>		
California	253	89,7	29	10,3	<b>3,60</b>	<b>1,32 - 9,80</b>	<b>3,26</b>	<b>1,18 - 9,01</b>		
<b>Habitantes por vivienda; n (%)</b>										
1 - 4	390	93,1	29	6,9	1			1		
≥5	469	92,7	37	7,3	1,05	0,62 - 1,78	1,14	0,66 - 2,00		
<b>Animales en la vivienda; n (%)</b>										
No	278	93,6	19	6,4	1			1		
Si	580	92,7	46	7,4	1,15	0,64 - 2,07	1,17	0,64 - 2,15		
<b>Servicio de electricidad, n (%)</b>										
Si	841	92,8	65	7,2	1			1		
No	5	100,0	0	0,0	CNA			CNA		
<b>Servicio de acueducto, n (%)</b>										
Si	407	93,6	28	6,4	1			1		
No	444	92,5	36	7,5	1,16	0,67 - 1,99	1,1	0,65 - 2,00		

\*Razón de prevalencia cruda, †Razón de prevalencia Ajustada por ocupación y edad, ‡Categoría de referencia, CNA: Convergencia no alcanzada



**Sup C3.5.** Asociación entre las características del individuo y la vivienda con las infecciones submicroscópicas por *Plasmodium* spp. que no desarrollaron síntomas durante el seguimiento

Característica	Infectados		PR cruda*		PR ajustada †	
	No	Si	PR	IC 95%	PR	IC 95%
<b>Individuo</b>						
<b>Sexo n (%)</b>						
Mujer	550	93,7	37	6,3	1#	1
Hombre	319	92,2	27	7,8	1,22	0,75 - 2,00
<b>Lugar de ocupación, n (%)</b>						
Interior	334	93,3	24	6,7	1	1
Exterior	487	92,8	38	7,2	1,14	0,68 - 1,90
<b>Edad, años; mediana(RI)</b>						
<6; n (%)	25,0	(11-41)	27,5	(11-40)		1,01
6-15; n (%)	63	91,3	6	8,7	1	0,99 - 1,02
16-25; n (%)	237	93,7	16	6,3	0,74	0,27 - 1,80
> 25; n (%)	142	94,7	8	5,3	0,66	0,20 - 1,70
	427	92,6	34	7,4	0,87	0,37 - 2,07
<b>Malaria previa, n (%)</b>						
No; n (%)	412	94,5	24	5,5	1	1
Si; n (%)	457	92,0	40	8,1	1,41	0,85 - 2,35
<b>Episodios malaria, episodios; mediana (RI)</b>						
0 n (%)	1	(0-2)	1	(0-2)		1
1 n (%)	412	94,5	24	5,5	1	0,79 - 2,78
>1 n (%)	197	91,2	19	8,8	1,57	0,86 - 2,87
	253	92,3	21	7,7	1,33	0,74 - 2,41
<b>Malaria el último año; n (%)</b>						
No	704	93,7	47	6,3	1	1
Si	161	90,5	17	9,6	1,40	0,79 - 2,49

Continuación **Sup C3.5.**

Característica	Infectados				PR cruda*			PR ajustada†		
	No	Si	PR	IC 95%	PR	IC 95%	PR	IC 95%		
<b>Vivienda</b>										
<b>Lugar; n (%)</b>										
Candelillas	199	97,1	6	2,9	1			1		
Robles	221	96,5	8	3,5	1,12	0,32 - 3,92	0,96	0,26 - 3,50		
Tangareal	196	90,3	21	9,7	<b>3,41</b>	<b>1,20 - 9,68</b>	<b>3,27</b>	<b>1,14 - 9,42</b>		
California	253	89,7	29	10,3	<b>3,61</b>	<b>1,31 - 9,95</b>	<b>3,26</b>	<b>1,16 - 9,17</b>		
<b>Habitantes por vivienda; n (%)</b>										
1 - 4	390	93,1	29	6,9	1			1		
≥5	469	93,1	35	6,9	1,00	0,58 - 1,71	1,13	0,61 - 2,08		
<b>Animales en la vivienda; n (%)</b>										
No	278	93,6	19	6,4	1			1		
Si	580	93,0	44	7,1	1,11	0,61 - 2,00	1,17	0,64 - 2,15		
<b>Servicio de electricidad, n (%)</b>										
Si	841	93,0	63	7,0	1			1		
No	5	100,0	0	0,0	CNA			CNA		
<b>Servicio de acueducto, n (%)</b>										
Si	407	93,6	28	6,4	1			1		
No	444	92,9	34	7,1	1,10	0,64 - 1,91	1,1	0,62 - 1,92		

\*Razón de prevalencia cruda, †Razón de prevalencia Ajustada por ocupación y edad, ‡Categoría de referencia, CNA: Convergencia no alcanzada

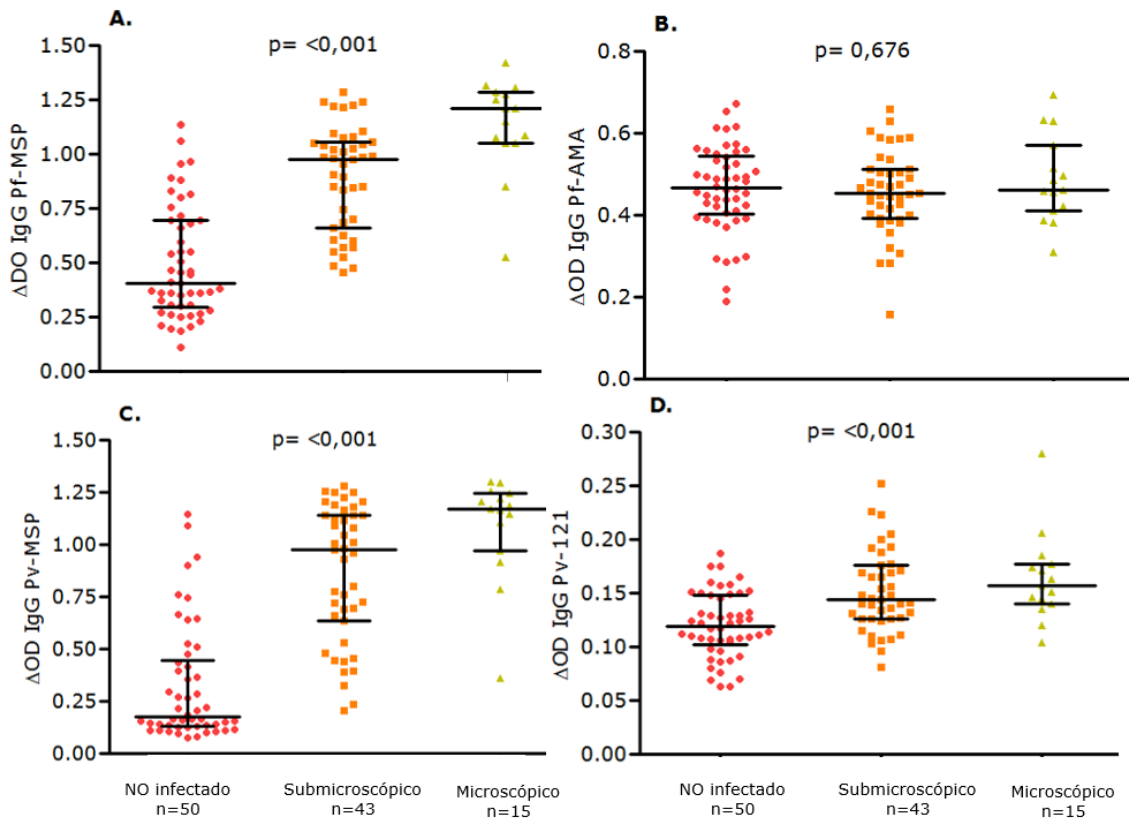


### Sup C3.6 Seropositividad frente a los anticuerpos IgG con los puntos de corte

Grupo de Infección	Anticuerpos IgG			
	Pf-MSP	Pf-AMA	Pv-MSP	Pv-121
<b>No infectadas, n; (mediana [RI]‡)</b>				
Seronegativas	9; (0,211 [0,194-0,252])	50; (0,466 [0,407-0,542])	20; (0,121[0,106-0,139])	29; (0,107 [0,087-0,112])
Seropositivas	41;(0,464 [0,363-0,717])	0	30; (0,382[0,216-0,646])	21; (0,150 [0,131-0,158])
<b>Infecciones submicroscópicas*, n; mediana (RI)</b>				
Seronegativas	3; (0,198[0,186-0,261])	66; (0,499 [0,386-0,514])	10; (0,119[0,098-0,132])	20; (0,107 [0,098-0,113])
Seropositivas	63; (0,848[0,523-1,025])	0	56; (0,852[0,442-1,131])	46; (0,160 [0,138-0,192])
<b>Infecciones microscópicas†, n; mediana (RI)</b>				
Seronegativas	0	15; (0,463 [0,411-0,572])	0	2; (0,112 [0,104-0,120])
Seropositivas	15; (1,209 [1,053-1,285])	0	15; (1,169[0,968-1,247])	13; (0,163 [0,146-0,177])

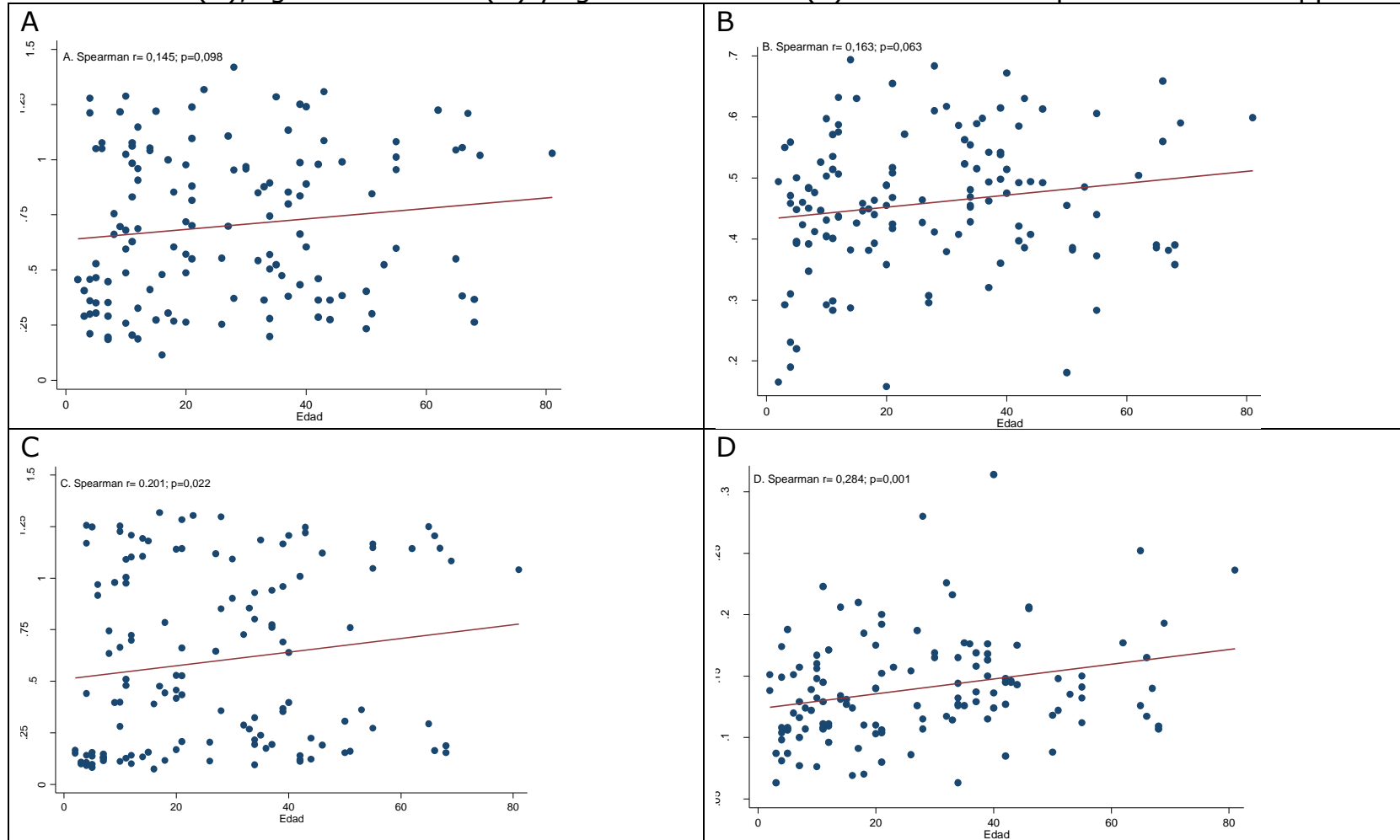
‡ Mediana y rango intercuartil de los niveles de anticuerpos IgG , \*Gota gruesa negativa y LAMP positiva, †Gota gruesa y LAMP positiva

**Sup C3.7.** Niveles de IgG contra Pf-MSP1 (A), Pf-AMA1 (B), Pv-MSP1 (C) y Pv-121 (D) en muestras positivas para *P. falciparum*.

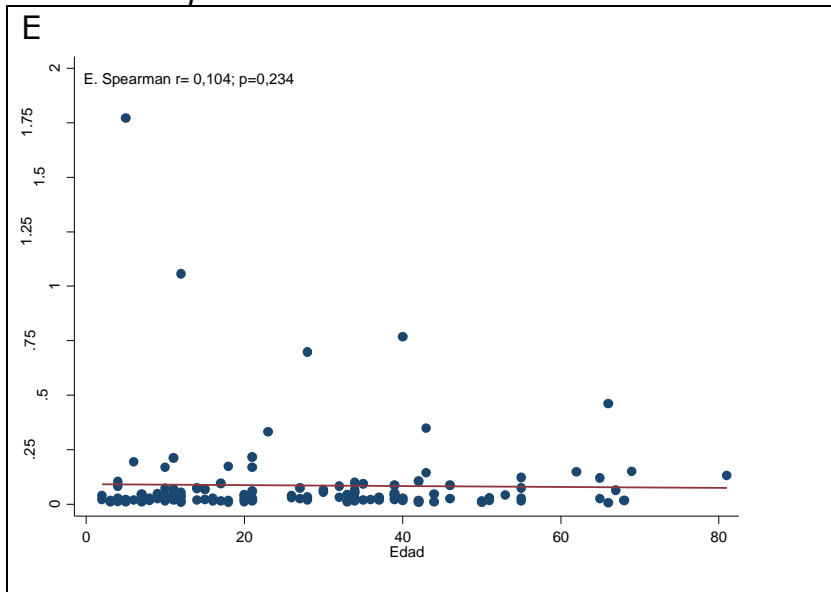


La línea horizontal localizada en el medio de la línea vertical representa la mediana del  $\Delta$ DO; las líneas horizontales a los extremos, representan el cuartil inferior y superior. Cada círculo rosado representa un participante no infectado, los cuadros naranja a cada participante con infección microscópica y los triángulos verdes con infección microscópica

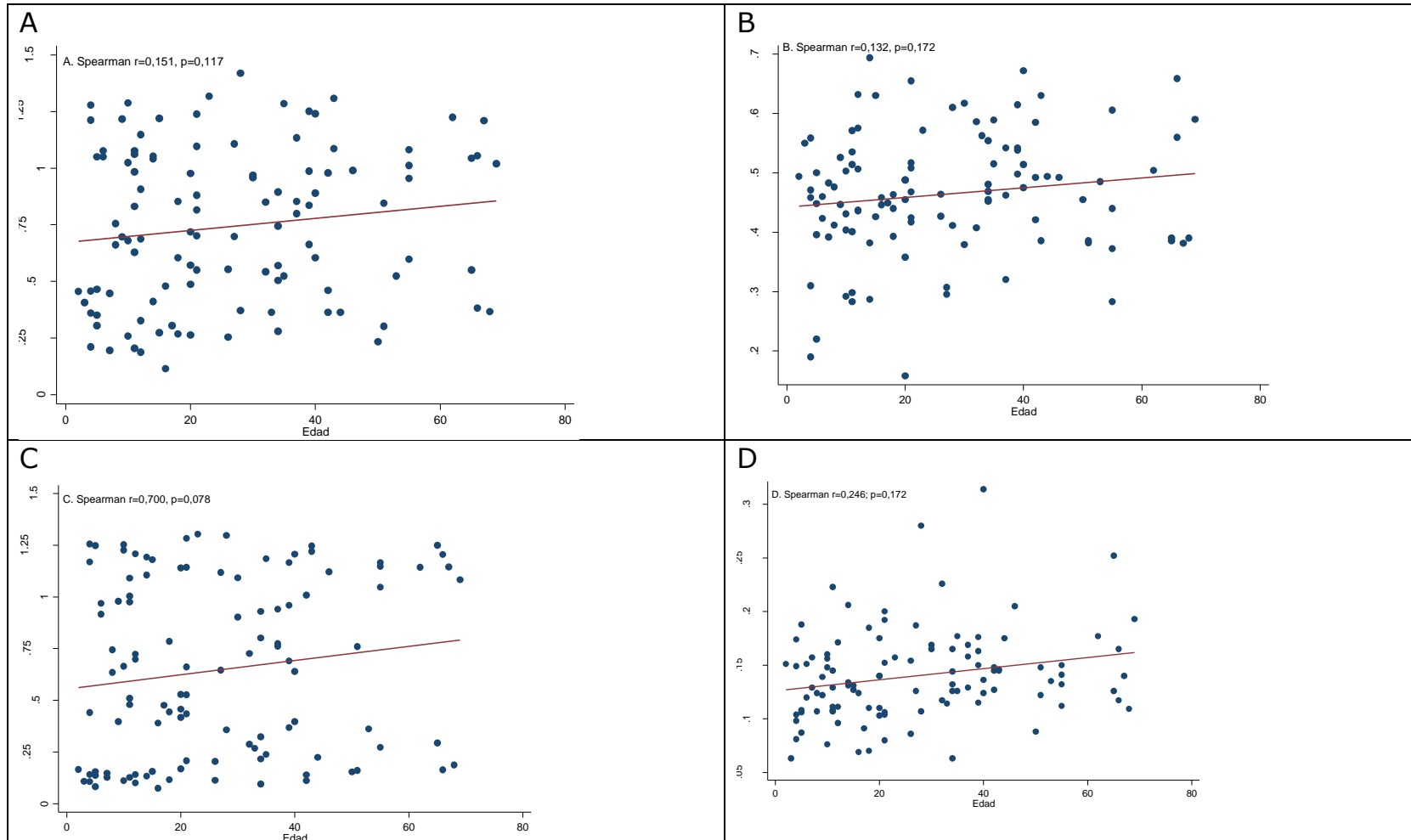
**Sup C3.8** Correlación entre los niveles de anticuerpos IgG anti Pf-MSP1 (A), IgG anti Pf-AMA (B), IgG anti Pv-MSP1 (C), IgG anti Pv-121 (D) y IgM anti Pf.MSP1 (E) en infecciones por *Plasmodium* spp.



Continuación *Sup C3.8*

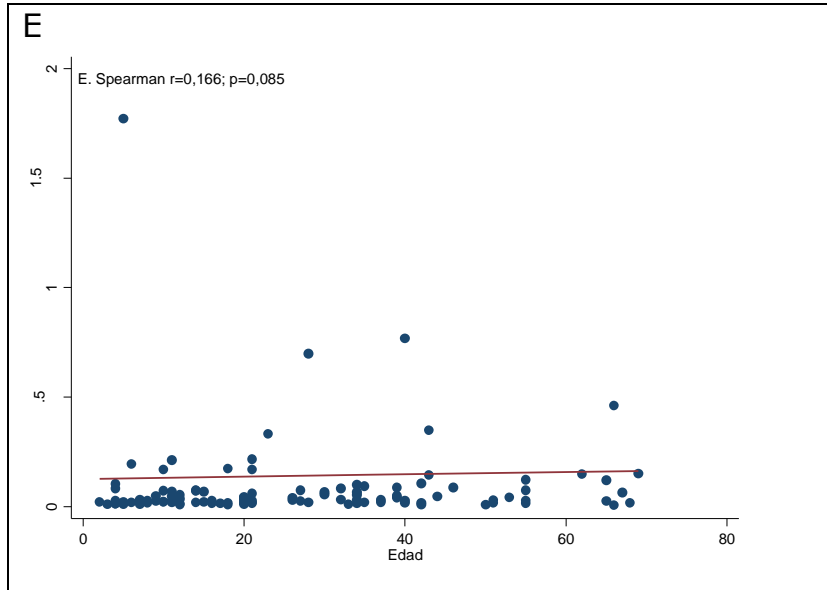


**Sup C3.9** Correlación entre los niveles de anticuerpos IgG anti Pf-MSP1 (A), IgG anti Pf-AMA1 (B), IgG anti Pv-MSP1 (C), IgG anti Pv-121 (D) y IgM anti Pf.MSP1 (E) solo en muestras positivas para *P. falciparum*





Continuación Sup C3.9



**Sup C4.1.** *Cálculo del tamaño de la muestra para un análisis de supervivencia empleando el modelo de riesgos proporcionales de Cox*

$$E = \frac{(z_{1-\alpha} + z_{1-\beta})^2}{\sigma^2 \beta_1^2 (1 - R^2)}$$

Donde E es el número de fallas,  $Z_\alpha$  es el nivel de confianza,  $Z_\beta$  es la potencia,  $\sigma^2$  es la desviación estándar,  $R^2$  es la correlación y  $\beta_1$  es el coeficiente de regresión de la covariable de interés (logaritmo natural del OR).

$$38 = \frac{(1,96 + 0,84)^2}{0,5^2 \times 0,92^2}$$

Una vez calculado el número de eventos a observar, se calculó el tamaño de la muestra así:

$$N = \frac{E}{P_E}$$

Donde  $P_E$  es la probabilidad de falla

$$54 = \frac{38}{0,7}$$

Adicionalmente, asumiendo un porcentaje de pérdidas del 20%, el tamaño de la muestra definitivo es:

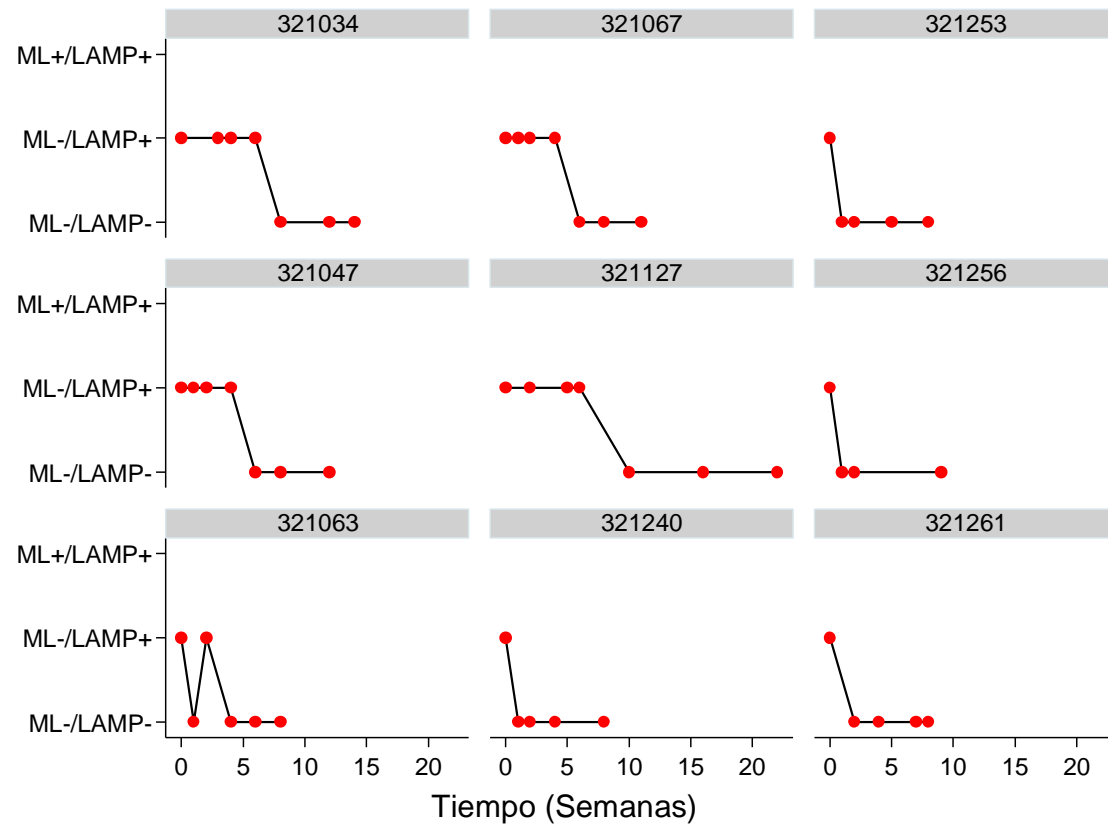
$$N_w = \frac{N}{1 - w}$$

Donde w es el porcentaje de pérdidas

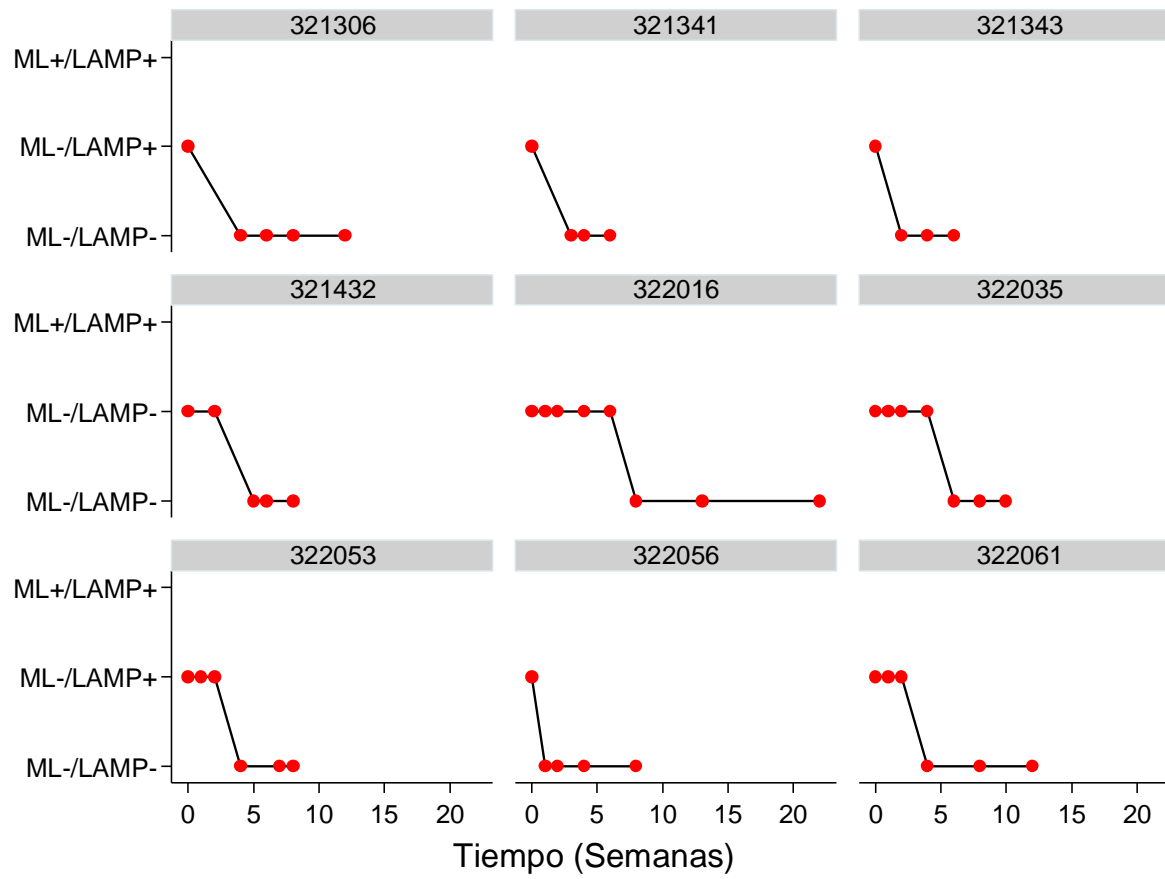
$$68 = \frac{54}{1 - 0,2}$$

**Sup C4.2.** Dinámica de las infecciones submicroscópicas en el tiempo según la combinación de los resultados de LAMP y microscopia de luz. Muestras que negativizaron la infección (A), que persistieron hasta el final del seguimiento (B), muestras que se perdieron en el seguimiento (C). Los puntos rojos representan cada seguimiento. ML: Microscopía de luz

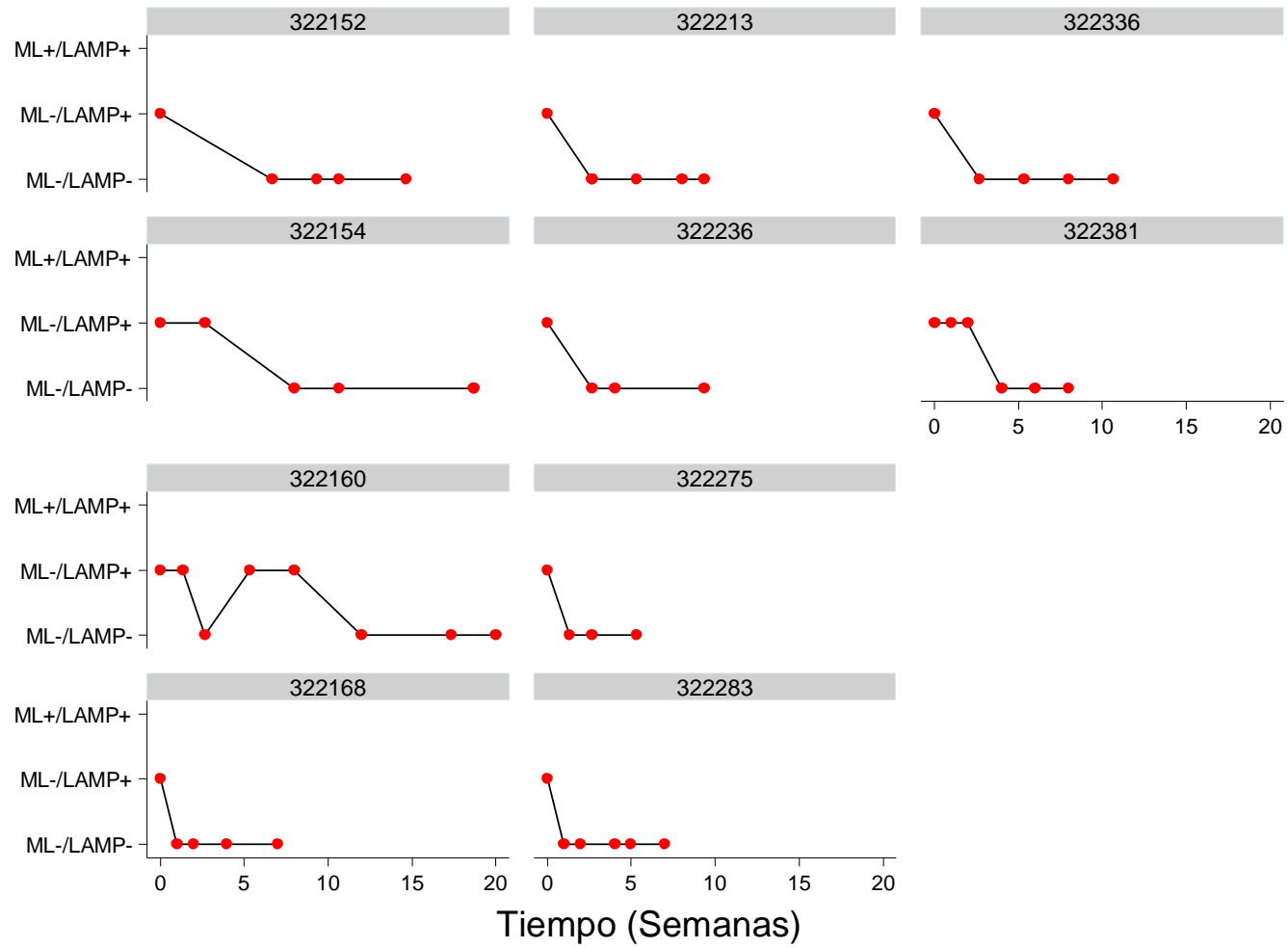
A.



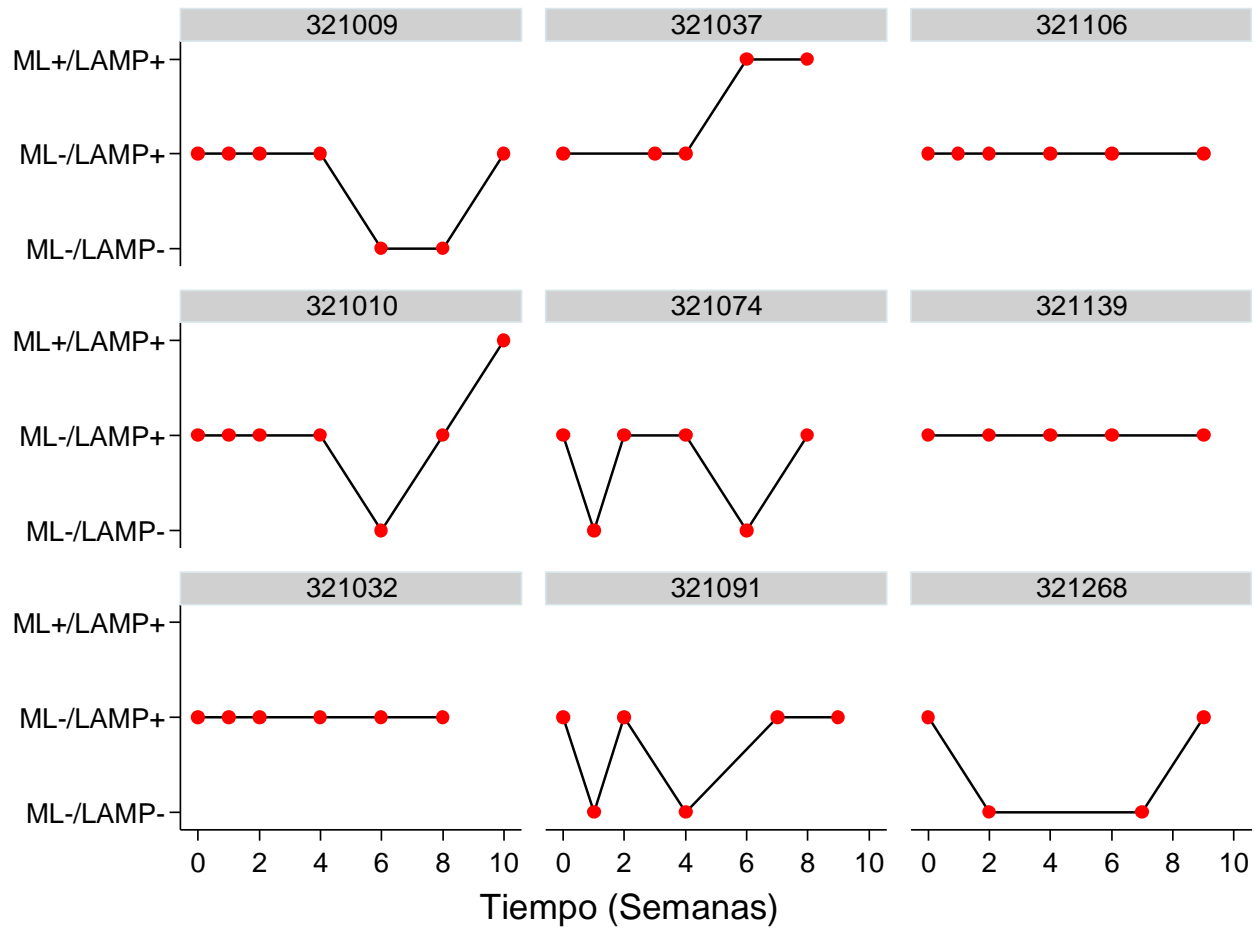
Continuación C4.2 A.



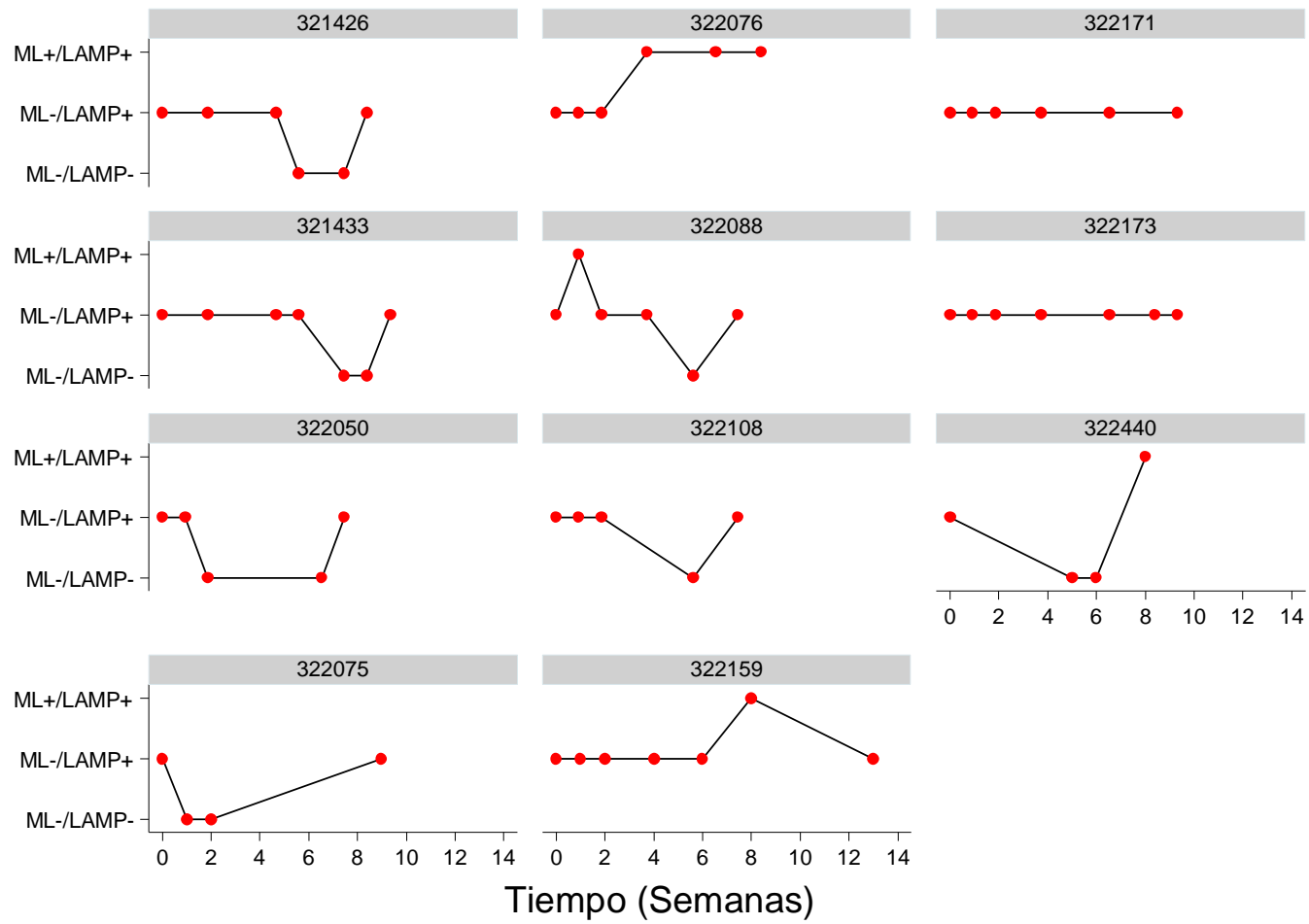
Continuación C4.2 A.



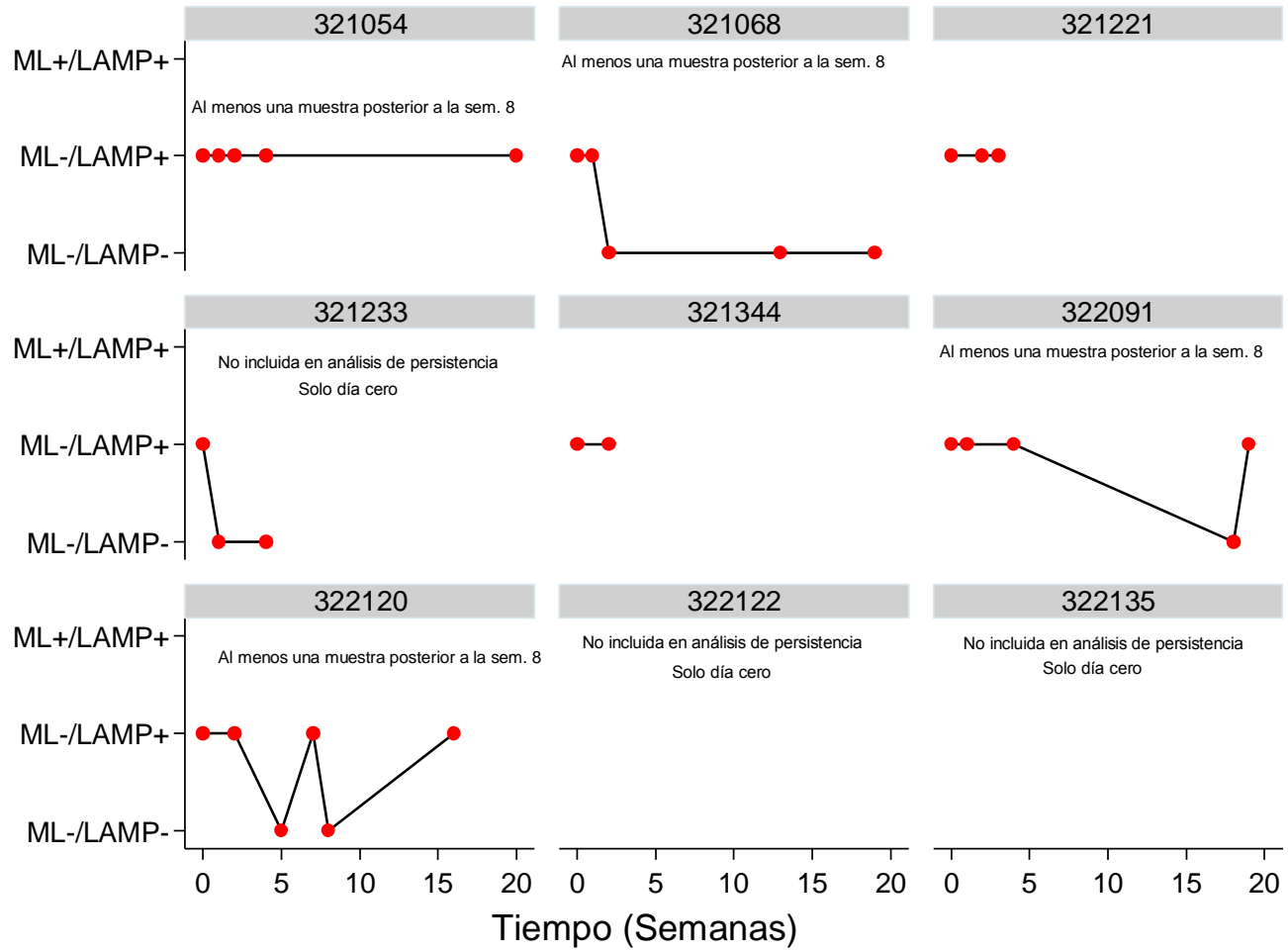
Continuación C4.2 B.



Continuación C4.2 B.

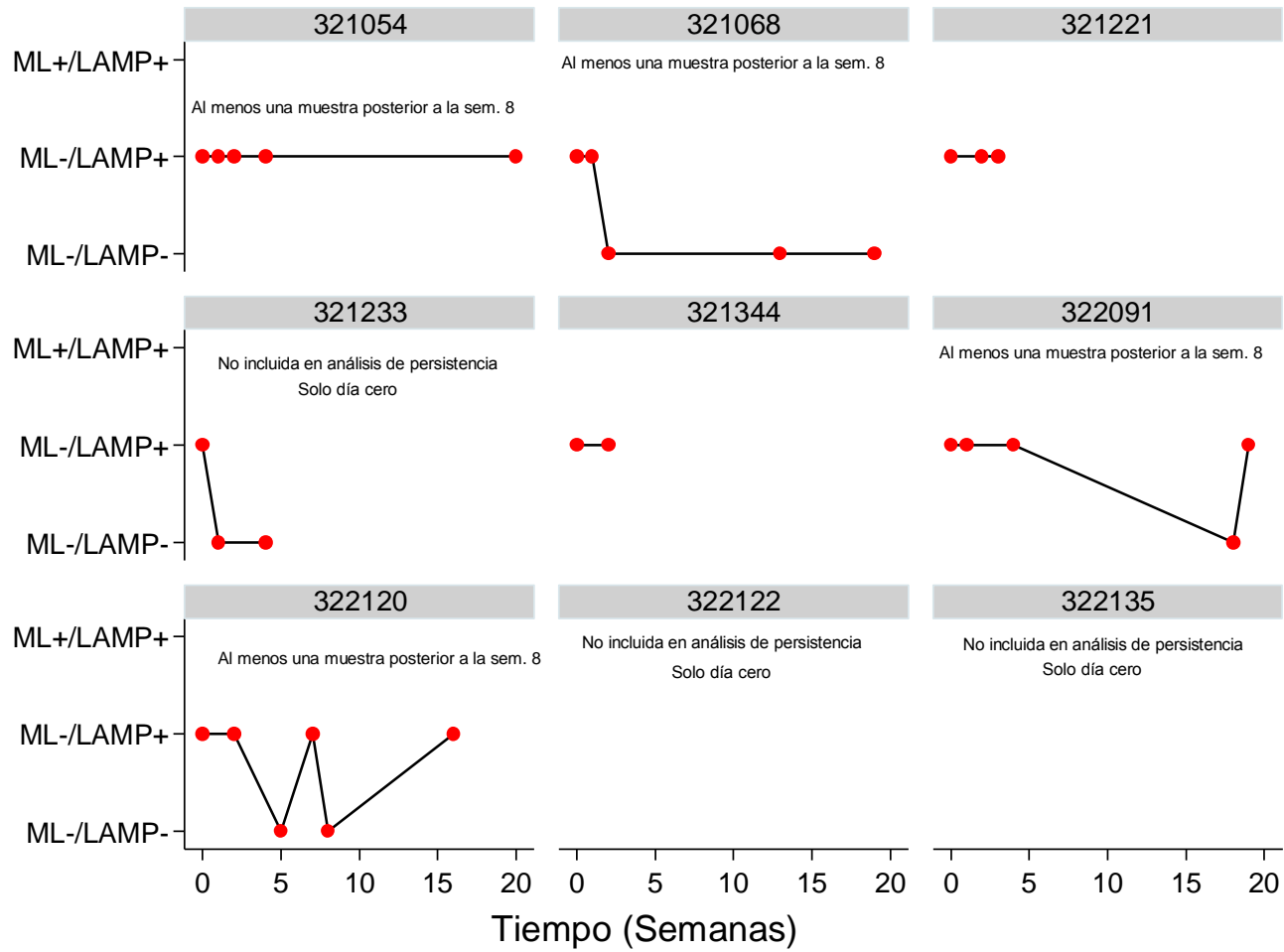


Continuación C4.2 C.





Continuación C4.2 C.



**Sup C4.3.** Estadísticos descriptivos de los niveles de anticuerpos en los individuos con infección submicroscópica

<b>Estadístico</b>	<b>Pf-MSP1</b>	<b>Pf-AMA1</b>	<b>Pv-MSP1</b>	<b>Pv-121</b>
<b>Mín-Máx</b>	0,186-1,288	0,158-0,684	0,092-1,318	0,077-0,314
<b>P25</b>	0,478	0,386	0,281	0,115
<b>P50</b>	0,840	0,449	0,724	0,139
<b>P75</b>	1,020	0,514	1,103	0,171

**Sup C4.4.** Asociación los niveles de anticuerpos categorizados según el percentil 50 con la negativización de la infección

Característica	Negativización de la infección		HR crudo		HR ajustado (edad)	
	No	Si	HR	IC 95%	HR	IC 95%
Niveles de anticuerpos según P50, n (%)						
<b>IgG Pf-MSP1</b>						
≤ P50	15 (45,5)	18 (54,5)	1*		1*	
> P50	23 (69,7)	10 (30,3)	0,47	0,21 - 1,03	0,46	0,20 - 1,03
<b>IgG Pv-MSP1</b>						
≤ P50	14 (42,4)	19 (57,6)	1*		1*	
> P50	24 (72,7)	9 (27,3)	0,42	0,19 - 0,93	0,40	0,17 - 0,92
<b>IgG Pf-AMA1</b>						
≤ P50	19 (57,6)	14 (42,4)	1*		1*	
> P50	19 (57,6)	14 (42,2)	1,03	0,49 - 2,17	1,07	0,49 - 2,33
<b>IgG Pv-121</b>						
≤ P50	14 (42,4)	19 (57,6)	1*		1*	
> P50	24 (72,7)	9 (27,3)	0,38	0,17 - 0,85	0,32	0,13 - 0,79
<b>IgM Pf-MSP1</b>						
≤ P50	18 (54,5)	15 (45,5)	1*		1*	
> P50	20 (60,6)	13 (39,4)	0,86	0,41 - 1,82	0,87	0,41 - 1,86

P50: Percentil 50, RI: Rango intercuartil, ΔDO: intensidad óptica corregida, HR: Hazard Ratio, IC: intervalo de confianza,\* Categoría de referencia

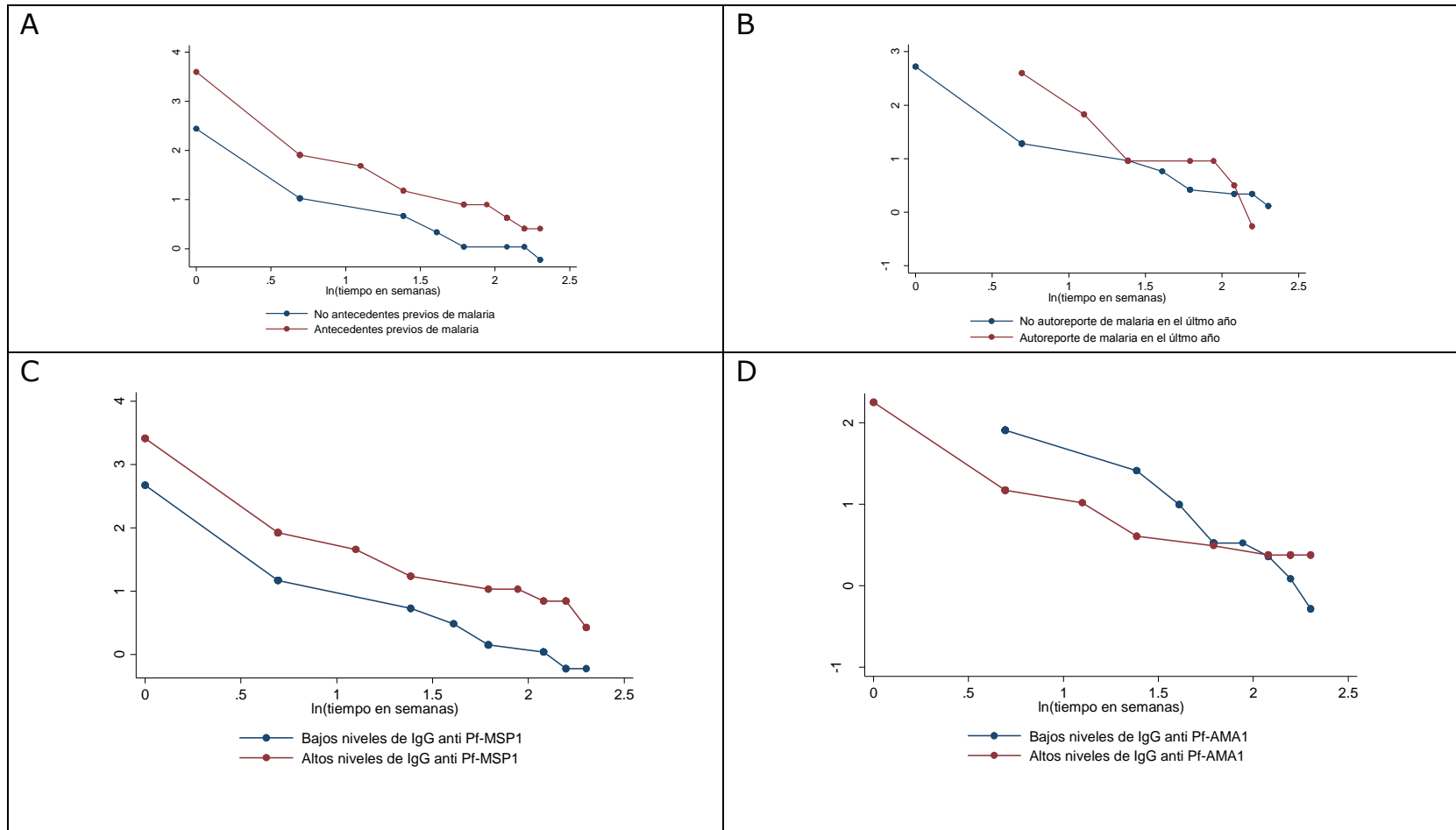
**Sup C4.5.** Valoración del supuesto de riesgos proporcionales basado en los residuales de Schoenfeld

Variable	Modelo			
	Crudo		Ajustado	
	Chi2*	Valor de p	Chi2	Valor de p
Antecedentes de malaria	0,530	0,467	0,520	0,771
Malaria en el último año	2,230	0,136	0,223	0,329
Nivel de anticuerpos IgG				
<i>IgG (<math>\Delta DO</math>)</i>				
Pf-MSP1	0,030	0,870	0,100	0,949
Pv-MSP1	0,270	0,606	0,400	0,801
Pf-AMA1	2,680	0,102	0,293	0,231
Pv-121	0,390	0,532	0,320	0,852
IgM				
Pf-MSP	1,400	0,237	1,410	0,494
<i>IgG según P50</i>				
IgG Pf-MSP1	0,150	0,694	0,190	0,912
IgG Pv-MSP1	1,170	0,280	1,480	0,477
IgG Pf-AMA1	6,070	0,014	6,440	0,040
IgG Pv-121	0,030	0,869	0,100	0,953
IgM Pf-MSP1	0,600	0,439	0,590	0,744

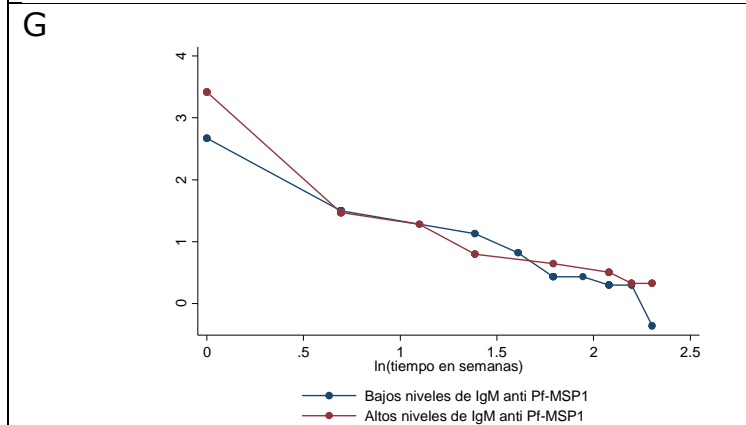
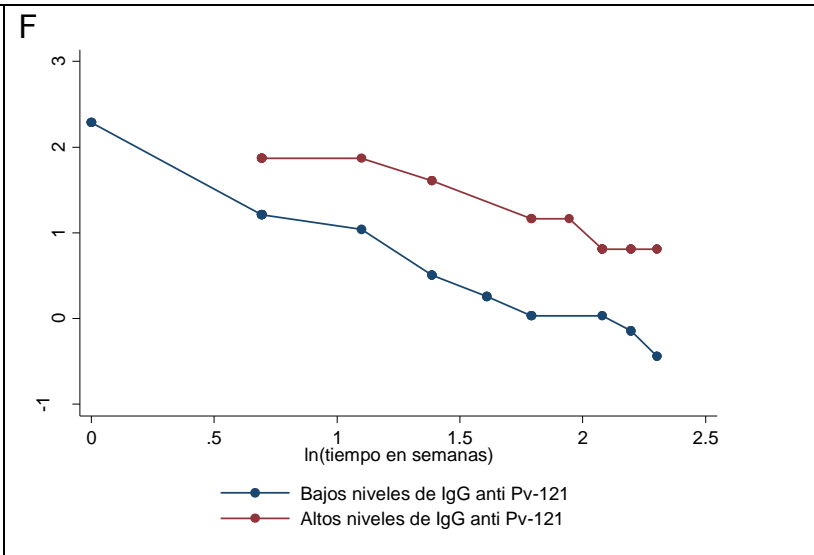
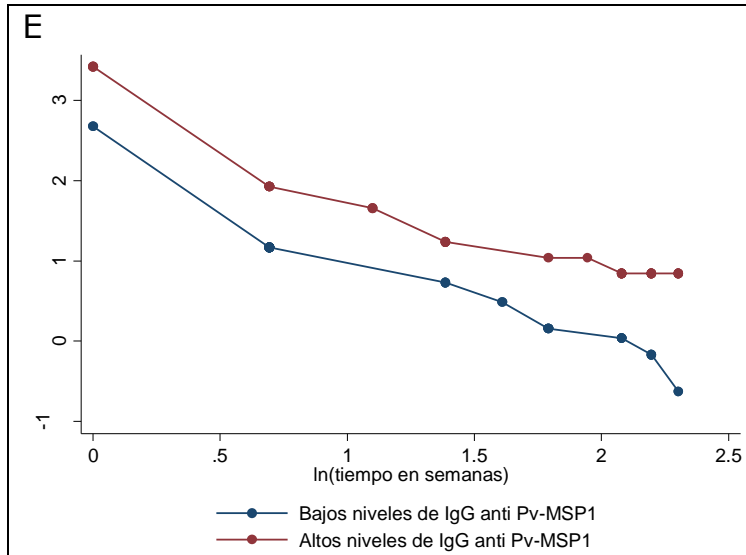
\* Chi2 y valor de p de la prueba de riesgos proporcionales.

H0= Los riesgos son proporcionales en el tiempo

**Sup C4.6.** Valoración del supuesto de riesgos proporcionales basado en las curvas log-log para las variables categóricas. Antecedentes de malaria (A), malaria en el último año (B), IgG anti Pf-MSP1 (C), IgG anti Pf-AMA1 (D), IgG anti Pv-MSP1 (E), IgG anti Pv-121



Continuación C4.6



**Sup C4.7.** Alelos microsatélite amplificados en infecciones submicroscópicas del día cero y seguimientos\*

<b>TA1 Cr.6</b>		<b>Poly-α Cr. 4</b>		<b>PfPK2 Cr.12</b>		<b>TA109 Cr.6</b>		<b>2490 Cr. 10</b>		<b>C3M69 Cr.3</b>	
<b>Alelo</b>	<b>n (%)</b>	<b>Alelo</b>	<b>n(%)</b>	<b>Alelo</b>	<b>n(%)</b>	<b>Alelo</b>	<b>n(%)</b>	<b>Alelo</b>	<b>n(%)</b>	<b>Alelo</b>	<b>n(%)</b>
141	1 (1.1)	147	16 (17.4)	168	3 (3.3)	160	22 (23.9)	72	17 (18.5)	117	1 (1.1)
156	2 (2.2)	150	3 (3.3)	174	16 (17.4)	184	1 (1.1)	78	1 (1.1)	123/125	7 (7.6)
171	12 (13.0)	153	1 (1.1)			196	25 (27.1)	81	1 (1.1)	125	2 (2.2)
231	1 (1.1)	156	1 (1.1)			202	2 (2.2)			129	1 (1.1)
		165	1 (1.1)							139	3 (3.3)
		180	4 (4.3)							161	1 (1.1)
<b>Clon E‡</b>	171	147		174		160		72		<b>140</b>	
<b>Clon D‡</b>	171	<b>174</b>		174		160		81		122	
<b>Clon E¶</b>	172	148		175		160		74		<b>138</b>	

\* *Los criterios de selección para la genotipificación fueron aquellas muestras PET PCR positivas (3) con una parasitemia  $\geq 4$  parásitos/ $\mu$ L o LAMP+/HRP2+ (4) (n=92). Solo 13/92 muestras (14.1%) amplificaron al menos para 5 alelos y provienen de muestras de 6 personas. De dos participantes se tienen 4 muestras, de uno se tienen 2 y de tres de ellos solo se amplificó una muestra*

† *Solo una muestra amplificó para los 6 alelos*

## Referencias

1. Sáenz FE, Morton LC, Okoth SA, Valenzuela G, Vera-Arias CA, Vélez-Álvarez E, et al. Clonal population expansion in an outbreak of Plasmodium falciparum on the northwest coast of Ecuador. Malar J. 2015;13 Suppl 1:497.
2. Griffing SM, Mixson-Hayden T, Sridaran S, Alam MT, McCollum AM, Cabezas C, et al. South American Plasmodium falciparum after the malaria eradication era: clonal population expansion and survival of the fittest hybrids. PLoS One. 2011;6(9):e23486.

3. Lucchi NW, Narayanan J, Karell MA, Xayavong M, Kariuki S, DaSilva AJ, et al. Molecular diagnosis of malaria by photo-induced electron transfer fluorogenic primers: PET-PCR. PLoS One. 2013;8(2):e56677.
4. Rogier E, Plucinski M, Lucchi N, Mace K, Chang M, Lemoine JF, et al. Bead-based immunoassay allows sub-picogram detection of histidine-rich protein 2 from Plasmodium falciparum and estimates reliability of malaria rapid diagnostic tests. PLoS One. 2017;12(2):e0172139.




**Sup C5.1** Fechas de captación y número de participantes en cada localidad

<b>Localidad</b>	<b>Área</b>	<b>Transporte</b>	<b>Distancia</b>	<b>Fecha de captación (Fase transversal)</b>		<b>Participantes</b>
			<b>(minutos)</b>	<b>Fecha inicio</b>	<b>Fecha finalización</b>	
California	Urbana	Moto	15	16/08/ 2017	02/10/2017	290
Tangareal	Periurbana	Carro	30	09/10/2017	27/11/2017	231
Robles	Rural	Carro	60	11/12/ 2017	31/01/2018	232
Candelillas	Rural	Carro	40	28/02/2018	16/04/2018	205
Total captados						958

## Anexos

### Anexo C3.1. Formulario de consentimiento informado

 <p>UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA</p>	<p><b>Formulario Consentimiento informado</b> Dinámica de las infecciones submicroscópicas por <i>Plasmodium</i> spp. en una zona endémica para malaria en Colombia</p>	<p><b>MALARIA</b> GRUPO DE INVESTIGACIÓN UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA SALUD PÚBLICA</p> <p><b>COMITE DE BIOETICA IIM.</b></p> <p>09/05/2017</p> <p><b>APROBADO</b></p>
---	---	--

#### Identificación de los investigadores

- **Alberto Tobón Castaño**, Medico, MSc. PhD Salud pública, alberto.tobon1@udea.edu.co
- **Bibiana Mena Criollo**, MSc Administración en Salud, saludpublicaidns@gmail.com
- **Pilar Pérez Cortes**, Bacterióloga, pilarperez37@gmail.com
- **Claudia Magali Valencia Vela**, Bacterióloga, clamaveva@yahoo.com.ar
- **Daniel Camilo Aguirre Acevedo**, Estadístico, Magister y PhD. en Epidemiología. daniel.aguirre@udea.edu.co
- **Ana María Vásquez**, Microbióloga y Bioanalista, PhD. en Biología. amvc.ana@gmail.com
- **Jehidys Montiel**, Microbióloga y Bioanalista, MSc, jehidys.montiel@udea.edu.co
- **Lina Marcela Zuluaga Idarraga**, Microbióloga y Bioanalista, MSc. PhD., linazulu83@gmail.com

#### Grupos de Investigación participantes:

- Grupo Malaria. Sede de Investigación Universitaria. Universidad de Antioquia. Calle 62 No. 52-59. Laboratorio 610, torre 1. Tel/Fax: 210 6487 e-mail: grupomalaria@udea.edu.co
- Instituto Departamental de Salud de Nariño. Calle 15 No. 28 - 41 San Juan de Pasto – Nariño. Conmutador: 7235428

**Sitios donde se llevará a cabo el estudio.** Municipios de Tumaco y Barbacoas (Nariño)

**Entidad que respalda la investigación:** Grupo Malaria de la Universidad de Antioquia e Instituto Departamental de Salud de Nariño

**Entidad que patrocina la investigación:** Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (COLCIENCIAS)

**Nombres y Apellidos del participante:** \_\_\_\_\_


**Código:** \_\_\_\_\_

**Lugar y fecha:** \_\_\_\_\_

#### Información para el paciente

La malaria o paludismo es una enfermedad producida por un parásito que se llama *Plasmodium* spp. y esta enfermedad es de gran importancia en Colombia. En algunas regiones donde la malaria es frecuente, se observa que hay personas que sin tener síntomas de malaria, están infectadas con el parásito que la produce, también hay personas con síntomas que van al puesto de salud para que les realicen el examen que detecta la infección y este sale negativo y por lo tanto no reciben tratamiento. En algunas ocasiones esta situación se presenta porque el examen que se practica de rutina (que se llama gota gruesa) y se realiza con la ayuda de un microscopio, no es capaz de identificar el parásito, estas infecciones se llaman submicroscópicas. Se desconoce cuánto tiempo pueden estar estas infecciones en las personas sin producir síntomas típicos de la enfermedad (fiebre, sudoración, escalofríos) o sin ser detectadas por la gota gruesa, lo cual es importante saber para conocer más a fondo este problema y para que las autoridades de salud puedan establecer las medidas necesarias para su

Fuentes: Declaración de Helsinki 2002, Resolución 008430 de 1993 del Ministerio Nacional de Salud, Normas éticas internacionales para la investigación en humanos. Decreto 2378 de 2008.

 <p>UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA</p>	<p align="center"><b>Formulario Consentimiento informado</b> Dinámica de las infecciones submicroscópicas por <i>Plasmodium</i> spp. en una zona endémica para malaria en Colombia</p>	<p align="center"><b>MALARIA</b> GRUPO DE INVESTIGACION UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA FACULTAD DE MEDICINA</p>
---	--	---

control. Para identificar las infecciones submicroscópicas en este proyecto vamos a utilizar una prueba diagnóstica que se llama PCR que tiene mejor desempeño que la gota gruesa.

El Grupo Malaria de la Universidad de Antioquia y el Instituto Departamental de Salud de Nariño, mediante este estudio tienen como propósito conocer cómo se comportan estas infecciones submicroscópicas en el tiempo y cuáles son las razones por las que se presentan. Este estudio tendrá una duración de tres años. Se realizará en veredas del departamento de Nariño donde el problema de la malaria es importante, además permitirá conocer más a fondo este problema para que las autoridades locales y departamentales tomen las medidas de control y prevención necesarias.

Este es un estudio que se realizará en dos etapas

- **Etapas:**
  - **Etapas:**
    - **Etapas:**
      - **Etapas:**

Este documento que le estamos compartiendo se llama consentimiento informado, se llama así porque usted (o su hijo) expresa que voluntariamente desea participar de esta investigación después de recibir toda la información relacionada con el proyecto. Hasta este momento sabemos que usted (o su hijo) cumple con los requisitos para ser incluido en esta investigación, por esta razón lo estamos invitando a participar de ella.


Su participación (o la de su hijo) será de gran importancia para su municipio y el departamento porque ayudaría a identificar la proporción de personas infectadas que no se detecta por las pruebas de rutina y además, que pasa con estas infecciones en el tiempo (si desarrollan malaria, si el sistema inmune de la persona logra eliminar el parásito o si la infección persiste). Lo anterior permitirá orientar y mejorar los esfuerzos de las actividades de promoción y prevención de la enfermedad.

La participación en este estudio es libre y voluntaria, y usted (o su hijo) tiene derecho a retirarse en cualquier momento. En caso de que no acepte participar o desee retirarse durante el seguimiento su atención en salud no se verá afectada. Antes de otorgar su consentimiento para participar, es importante que usted lea y comprenda la siguiente explicación acerca de los procedimientos del estudio y que nos dé una información básica para diligenciar una encuesta.

**Procedimiento del estudio**

Si usted (o su hijo) desea participar en este estudio, el día del ingreso se le tomará una muestra de 6mL de sangre de la vena (punción venosa), y con esta sangre realizaremos diagnóstico microscópico de malaria (gota gruesa) y molecular (PCR). Además se harán unas pruebas de laboratorio adicionales que se llaman ELISA, RT-PCR y electroforesis capilar y los resultados de todas estas pruebas nos ayudaran a saber porque se presentan las

Fuentes: Declaración de Helsinki 2002, Resolución 008430 de 1993 del Ministerio Nacional de Salud, Normas éticas internacionales para la investigación en humanos. Decreto 2378 de 2008.

 <p>UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA</p>	<p><b>Formulario Consentimiento informado</b> Dinámica de las infecciones submicroscópicas por <i>Plasmodium</i> spp. en una zona endémica para malaria en Colombia</p>	<p>COMITE DE BIOETICA I I M.</p> <p>09 de Mayo 2017</p> <p><b>APROBADO</b></p> <p>UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA FACULTAD DE MEDICINA</p>
---	---	---

infecciones submicroscópicas. Adicionalmente le haremos unas preguntas relacionadas con su estado de salud, lugar de residencia, cuantas veces le ha dado malaria y otras preguntas relacionadas.

Si usted (o su hijo) tiene infección por el parásito detectada por gota gruesa recibirá el esquema de tratamiento antimalárico vigente aprobado por el Ministerio de la Protección Social de Colombia de acuerdo a la especie de malaria (se les llama antimalárico ya que ayudan a matar los parásitos en la sangre). Este tratamiento será suministrado por el programa de malaria en los diferentes municipios donde se desarrolle el estudio y el personal del estudio garantizará la correcta administración del tratamiento. Si por el contrario, a usted (o a su hijo) no se le detecta infección por las técnicas empleadas, no habrá necesidad de tratarlo ni de hacerle seguimiento.

Por otra parte, si usted (o su hijo) tienen la infección por *Plasmodium* spp. detectada únicamente por la prueba molecular, serán vigilados por una auxiliar de enfermería al día 7, 14, 28, 42 y 56 posterior a la primera muestra de sangre tomada, o cualquier día adicional cuando presente síntomas de malaria. Los días de seguimiento 7, 14, 28, 42 y 56 se le tomará una muestra sacando un par de gotas de sangre de su dedo índice con una lanceta nueva que solo la usaremos con usted (o su hijo) y después será desechada. Esta muestra será para hacer la prueba de la gota gruesa y la prueba molecular. En todos los controles se les preguntara a usted (o su hijo) si ha tenido fiebre sudoración, escalofríos y otros síntomas relacionados con malaria.

Si usted (o su hijo) en cualquiera de los seguimientos presenta una gota gruesa positiva independiente de la presencia de síntomas será remitido al puesto de salud para que se le administre el tratamiento que se suministra en el país de acuerdo con las guías aprobadas en Colombia. Si usted (o su hijo) presenta fiebre en cualquiera de los controles, pero tienen una gota gruesa negativa se le hará tres gotas gruesas consecutivas para descartar malaria, si los síntomas persisten será remitido al puesto de salud para que le hagan otros exámenes diagnósticos.

Toda la información que usted (o su hijo) nos suministre en la encuesta y de los resultados de los análisis de laboratorio, será guardada de manera confidencial por los investigadores del Grupo Malaria en las instalaciones de la Sede de Investigación Universitaria de la Universidad de Antioquia, ubicada en Medellín, en donde se realizarán los análisis de los datos. La información de usted (o de su hijo) será guardada con un código que tiene letras y números asignado al ingreso del estudio y no por sus nombres para proteger su información personal.

#### Riesgos potenciales



La toma de muestra de sangre por punción venosa hace parte de los procedimientos de rutina en los procesos de diagnóstico y no implican riesgos importantes para su salud (o la de su hijo) y serán realizados con la correcta desinfección de la piel, por parte de personal profesional. La toma de sangre del brazo puede ocasionar un dolor leve en el lugar de la punción y en algunas ocasiones puede producir un morado en la piel. Sólo se tomará de sangre un frasquito de 6mL de sangre lo cual significa un riesgo mínimo para su salud.

#### Participación voluntaria

Su participación en el estudio (o la de su hijo), es voluntaria, su autonomía será respetada. Los requisitos para la participación son: no haber tenido diagnóstico de malaria y/o consumo de tratamiento antimalárico en las últimas

Fuentes: Declaración de Helsinki 2002, Resolución 008430 de 1993 del Ministerio Nacional de Salud, Normas éticas internacionales para la investigación en humanos. Decreto 2378 de 2008.



 <p>UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA</p>	<p align="center"><b>Formulario Consentimiento informado</b> Dinámica de las infecciones submicroscópicas por <i>Plasmodium</i> spp. en una zona endémica para malaria en Colombia</p>	 <p><b>MALARIA</b> GRUPO DE INVESTIGACION UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA FACULTAD DE MEDICINA</p>
---	--	--

4 semanas, no planear trasladarse de su lugar de residencia en los próximos dos meses y si es mujer, no estar en embarazo.

#### **Incentivos**

Usted no incurrirá en ningún tipo de gasto, pero tampoco será compensado económicamente por participar en el estudio. El personal del estudio lo visitará a su domicilio para los seguimientos, o de ser necesario se le facilitará un medio de transporte para que visite el puesto de diagnóstico el día que le corresponda el seguimiento. Ni usted ni su familia recibirán dinero o algún tipo de compensación por la participación en el estudio.

#### **Confidencialidad**

Los investigadores tenemos obligación de guardar en secreto su información personal y la de su salud, responderle clara y oportunamente todas las preguntas relacionadas con la investigación y presentar a usted los resultados de esta investigación si así lo requiere. Este consentimiento no libera a los investigadores, ni a la Universidad de Antioquia ni a al Instituto Departamental de Salud de Nariño de la obligación de responder por cualquier acto o conducta inapropiada. Los datos de esta investigación se comunicarán a las autoridades sanitarias para que hagan uso de ellos en los programas de atención de malaria. Su nombre, (o el de su hijo) o el de sus familiares no aparecerá en ningún informe.

#### **Alternativas del estudio:**

Para hacer estudios de malaria es necesario la obtención de muestras de sangre de las personas por lo que su participación y colaboración es necesaria para el éxito del estudio. Las pruebas de laboratorio usadas en este proyecto son innovadoras en Colombia, con comprobados resultados positivos en el mundo. Los procedimientos de obtención de sangre serán realizados antes de la administración del tratamiento de rutina para la malaria si usted (o su hijo) es positivo por gota gruesa al ingreso al estudio. Este estudio cumplirá en todo momento con los procedimientos estipulados en la guía de atención del paciente con Malaria.

#### **Beneficios para el participante**

Usted (o su hijo) no se beneficiará directamente de participar en este estudio, pero si usted (o su hijo) llega a tener una infección submicroscópica tendrá un diagnóstico oportuno y recibirá tratamiento al finalizar el estudio. Además, esperamos que los resultados obtenidos de esta investigación permitan identificar cuantas infecciones no se están detectando por gota gruesa y que está pasando con las personas que la tienen.



#### **Obligaciones del participante**

Al firmar este consentimiento usted (o su hijo) acepta que se le tomen las muestras correspondientes y acepta contestar las preguntas de la encuesta, sin embargo también puede negarse a contestar aquellas que usted considere.

#### **Compromiso de los investigadores**

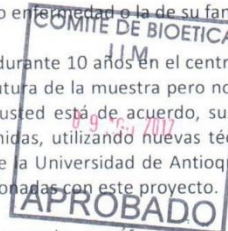
Los investigadores nos comprometemos a: 1) Guardar en secreto su información personal 2) Responderle clara y oportunamente todas las preguntas relacionadas con la investigación, 3) Presentar a usted los resultados de esta investigación si usted lo desea

Fuentes: Declaración de Helsinki 2002, Resolución 008430 de 1993 del Ministerio Nacional de Salud, Normas éticas internacionales para la investigación en humanos. Decreto 2378 de 2008.

 <p>UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA</p>	<p align="center"><b>Formulario Consentimiento informado</b> Dinámica de las infecciones submicroscópicas por <i>Plasmodium</i> spp. en una zona endémica para malaria en Colombia</p>	 <p><b>MALARIA</b> GRUPO DE INVESTIGACION UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA FACULTAD DE MEDICINA</p>
---	--	--

Los investigadores no financiaremos estudios adicionales sobre su salud o enfermedad o la de su familia.

Las muestras de sangre sobrantes de estos análisis, serán almacenadas durante 10 años en el centro responsable del estudio y se marcarán con un código que permite la identificación futura de la muestra pero no del paciente. Después de este periodo las muestras sobrantes serán destruidas. Si usted está de acuerdo, sus muestras se podrán utilizar en el futuro con el mismo fin para el que fueron obtenidas, utilizando nuevas técnicas para su análisis si es necesario, con una nueva probación del comité de ética de la Universidad de Antioquia. En ningún momento las muestras se emplearán para pruebas diferentes a las relacionadas con este proyecto.



¿Autoriza usted a que sus muestras (o las de su hijo) sean almacenadas y usadas para futuros estudios del grupo de investigación?

Si  No

¿Autoriza usted a que la información obtenida de sus muestras (o las de su hijo) sea usada para futuros estudios del grupo de investigación?

Si  No

**Divulgación**

Los resultados de este estudio serán publicados e informados a las autoridades competentes pero su identidad no aparecerá en ninguna publicación o informe. Toda la información será guardada de manera confidencial por los investigadores del Grupo Malaria y del Instituto Departamental de Salud de Nariño, en las instalaciones de la Sede de Investigaciones Universitaria de la Universidad de Antioquia, ubicada en Medellín, en donde se realizaran los análisis de los datos.

**Resultados esperados**


Esta investigación permitirá conocer cuántas infecciones hay por los parásitos de la malaria que la gota gruesa está dejando de detectar. Por otra parte, se podrá conocer cuántas de estas infecciones pueden en algún momento convertirse en un episodio de malaria, eliminar por si mismas la infección o permanecer en la sangre durante dos meses, además de conocer las razones por las cuales esto pasa. Todo esto generará conocimiento importante que podrá ser usado posteriormente para el diseño e implementación de programas de prevención, diagnóstico oportuno y tratamiento de estas infecciones.

**Personas a contactar para información**

Usted tiene derecho a recibir una copia del presente documento y a que se le respondan satisfactoriamente todas las preguntas respecto al estudio que se le ocurran ahora o en cualquier momento. Para esto podrá contactar al personal del Grupo Malaria o a los responsables del estudio en Tumaco (Pilar Pérez 7272817, 7272363) y en Medellín a Alberto Tobón y Jehidys Montiel en los teléfonos **2196486, 2196585** o en el fax **2196487**.

Esta propuesta ha sido revisada y aprobada por un Comité de Revisión de la Universidad de Antioquia. Este es un comité que se asegura de que los participantes del estudio están protegidos de riesgos. Si desea conocer algo más

Fuentes: Declaración de Helsinki 2002, Resolución 008430 de 1993 del Ministerio Nacional de Salud, Normas éticas internacionales para la investigación en humanos. Decreto 2378 de 2008.

 <p>UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA 1957</p>	<p align="center"><b>Formulario Consentimiento informado</b> Dinámica de las infecciones submicroscópicas por <i>Plasmodium</i> spp. en una zona endémica para malaria en Colombia</p>	<p align="center"><b>MALARIA</b></p> <p><small>GRUPO DE INVESTIGACIÓN UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA FACULTAD DE MEDICINA</small></p>
--	--	---

acerca de este comité, puede ponerse en contacto con el Doctor **Gabriel Jaime Montoya M.** Instituto de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina – Universidad de Antioquia. **Caracas ID: 1510672941** Teléfonos: **2196060 – 2196090.**

I I M.  
08.11.2017  
**APROBADO**

**Retiro del estudio**

Usted puede retirarse del estudio en cualquier momento sin ninguna consecuencia para usted (o su hijo) y podrá realizar las preguntas que considere necesarias durante el estudio, las cuales deben ser respondidas a su entera satisfacción por el grupo de investigadores.

Declaro que he leído o se me ha leído la información anterior. He tenido la oportunidad de hacer preguntas al respecto y cualquier pregunta que he hecho, me ha sido contestada a mi satisfacción. Doy mi consentimiento voluntariamente para participar en este estudio y consiento que las muestras tomadas se guarden hasta por 10 años

**Conflicto de interés**

El estudio carece de conflictos de interés y de compromisos comerciales y políticos.

**Firma del paciente**

Manifiesto que no he recibido presiones verbales, escritas o con gestos para participar en el estudio; que dicha decisión la tomo en pleno uso de mis facultades mentales, sin encontrarme bajo efectos de medicamentos, drogas o bebidas alcohólicas, consciente y libremente.

Firmando este documento, usted manifiesta que acepta libremente participar y que comprende todos los aspectos de esta investigación.

\_\_\_\_\_  
Firma y CC del voluntario  
Dirección

\_\_\_\_\_  
Firma y CC de representante legal  
(si el paciente es menor de edad)

\_\_\_\_\_  
Firma y CC del testigo 1  
Dirección

\_\_\_\_\_  
Firma y CC del testigo 2  
Dirección


\_\_\_\_\_  
Firma y CC del investigador  
Teléfono

\_\_\_\_\_  
Fecha (día/mes/año)

Fuentes: Declaración de Helsinki 2002, Resolución 008430 de 1993 del Ministerio Nacional de Salud, Normas éticas internacionales para la investigación en humanos. Decreto 2378 de 2008.



## Anexo C3.2. Formulario de asentimiento informado

 <p>UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA 1826</p>	<p><b>Formulario Asentimiento Informado</b> Dinámica de las infecciones submicroscópicas por <i>Plasmodium</i> spp. en una zona endémica para malaria en Colombia</p>	<p><b>MALARIA</b> GRUPO DE INVESTIGACION UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA FACULTAD DE MEDICINA</p>
--	---	--

### Identificación de los investigadores

- **Alberto Tobón Castaño**, Medico, MsC. PhD Salud pública, alberto.tobon1@udea.edu.co
- **Bibiana Mena Criollo**, MSc Administración en Salud, saludpublicaidn@gmail.com
- **Pilar Pérez Cortes**, Bacterióloga, pilarperez37@gmail.com
- **Claudia Magali Valencia Vela**, Bacterióloga, clamaveva@yahoo.com.ar
- **Daniel Camilo Aguirre Acevedo**, Estadístico, Magister y PhD. en Epidemiología. daniel.aguirre@udea.edu.co
- **Ana María Vásquez**, Microbióloga y Bioanalista, PhD. en Biología. amvc.ana@gmail.com
- **Jehidys Montiel**, Microbióloga y Bioanalista, MSc, jehidys.montiel@udea.edu.co
- **Lina Marcela Zuluaga Idarraga**, Microbióloga y Bioanalista, MSc. PhD., lina.zuluaga83@gmail.com



### Grupos de Investigación participantes:

- Grupo Malaria. Sede de Investigación Universitaria. Universidad de Antioquia. Calle 62 No. 52-59. Laboratorio 610, torre 1. Tel/Fax: 210 6487 e-mail: grupomalaria@udea.edu.co
- Instituto Departamental de Salud de Nariño. Calle 15 No. 28 - 41 San Juan de Pasto – Nariño. Conmutador: 7235428

**Sitios donde se llevará a cabo el estudio:** Municipios de Tumaco y Barbacoas (Nariño)

**Entidad que respalda la investigación:** Grupo Malaria de la Universidad de Antioquia e Instituto Departamental de Salud de Nariño.

**Entidad que patrocina la investigación:** Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (COLCIENCIAS)

**Nombres y Apellidos del participante:** \_\_\_\_\_

**Código:** \_\_\_\_\_

**Lugar y fecha:** \_\_\_\_\_

### Información para el paciente

#### Introducción



Estamos haciendo un estudio para entender que pasa con las personas que están infectadas con el parásito que causa la malaria o paludismo cuando los parásitos no se ven en el microscopio. La malaria o paludismo es una de las enfermedades más comunes y peligrosas en Nariño, sin embargo, puede ser tratada con medicamentos. Estamos invitando a todos los niños y adultos a participar en este estudio para mirar si ellos tienen la infección con el parásito y a quienes tienen la infección los estamos visitando durante dos meses para saber si los parásitos desaparecen en este tiempo.

#### Participación Voluntaria

Te doy esta información para invitarte a participar de este estudio de investigación. Puedes elegir participar o no. Hemos discutido esta investigación con tus padres (ó apoderado) y ellos saben que te estamos preguntando a ti

Fuentes: Declaración de Helsinki 2002, Resolución 008430 de 1993 del Ministerio Nacional de Salud, Normas éticas internacionales para la investigación en humanos. Decreto 2378 de 2008.



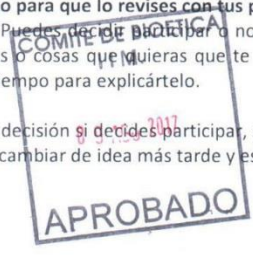
 <p>UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA</p>	<p align="center"><b>Formulario Asentimiento Informado</b> Dinámica de las infecciones submicroscópicas por <i>Plasmodium</i> spp. en una zona endémica para malaria en Colombia</p>	 <p><b>MALARIA</b> GRUPO DE INVESTIGACIÓN UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA FACULTAD DE MEDICINA</p>
---	--	--

también para tu aceptación. Si vas a participar en la investigación, tus padres (ó apoderado) también tienen que aceptarlo. Pero si no deseas tomar parte en la investigación no tienes por qué hacerlo, aun cuando tus padres lo hayan aceptado. **Además, se te entregará una copia de éste documento para que lo revises con tus padres.**

Puedes discutir cualquier aspecto de este documento con tus padres. **Puedes decidir participar o no después de haberlo discutido.** Puede que haya algunas palabras que no entiendas o cosas que quieras que te las explique mejor, puedes pedirme que pare en cualquier momento y me tomaré tiempo para explicártelo.

No tienes por qué participar en esta investigación si no lo deseas. Es tu decisión **si decides participar**, si no quieres participar solo dímelo y nada cambiará. Si dices que "sí" ahora, puedes cambiar de idea más tarde y estará bien.

Entiendo que mi participación es voluntaria \_\_\_\_\_ (poner una X)



**Procedimientos del estudio**

Esta investigación incluirá a todas las personas que acepten participar, hoy se te tomará una muestra de sangre de tu brazo, y si eres de las personas que tienen la infección, te visitaremos a tu casa otras seis veces más a sacarte solo dos gotitas de sangre.

Entiendo los procedimientos que se realizarán \_\_\_\_\_ (poner una X)

**Riesgos**

Es posible que durante la toma de la muestra de sangre experimentes un poco de dolor o miedo cuando el dedo se pincha o cuando te estemos sacando la sangre de la vena. Las cantidades de sangre que se toman son muy pequeñas y no afectarán tu salud, generalmente solo se produce un poco de enrojecimiento y endurecimiento en el sitio donde se toma la muestra. Esto debería de desaparecer en un día. Si duele por más tiempo o si se endurece por más tiempo o se hincha, comunícaselo a tus padres o a mí. Si te sientes mal, dímelo.

**Beneficios:** Si decides participar en este estudio, los síntomas relacionados con la malaria o con el tratamiento de la malaria serán tratados sin costo alguno. Si te enfermas de malaria durante la investigación, el médico te atenderá y tratará la infección. Tu participación nos ayudará entender que les pasa a las personas que tienen el parásito y no fueron diagnosticadas en el puesto de salud, esto beneficiará a las personas de tu vereda porque después el gobierno tendrá información importante para hacer campañas para prevenir este problema.


Entiendo los riesgos y beneficios \_\_\_\_\_ (poner una X)

**Incentivos:** Este estudio no tiene ningún costo para tus padres. Si participas no habrá ningún pago o regalo por hacerlo. Si te enfermas de malaria durante la investigación, el médico te atenderá y te dará el tratamiento necesario.

**Confidencialidad**

Toda la información que conozcamos acerca de ti y tu estado de salud solo la sabremos nosotros y no se la daremos a nadie diferente a tus padres o al médico para que te atienda.

Fuentes: Declaración de Helsinki 2002, Resolución 008430 de 1993 del Ministerio Nacional de Salud, Normas éticas internacionales para la investigación en humanos. Decreto 2378 de 2008.

 <p>UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA</p>	<p><b>Formulario Asentimiento Informado</b> Dinámica de las infecciones submicroscópicas por <i>Plasmodium</i> spp. en una zona endémica para malaria en Colombia</p>	<p><b>MALARIA</b> GRUPO DE INVESTIGACION UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA FACULTAD DE MEDICINA</p>
---	---	--

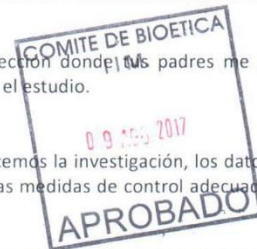
Puedes hacerme preguntas ahora o más tarde. Tengo un número y dirección donde mis padres me pueden localizar en casos que crean que tienes malaria o para cualquier duda sobre el estudio.

**Divulgación**

Al finalizar tu participación te informaremos los resultados y cuando finalicemos la investigación, los datos serán entregados a los encargados de la salud en el municipio para que tomen las medidas de control adecuadas para solucionar el problema.

Si elegiste ser parte de esta investigación, también te daré una copia de esta información para ti. Puedes pedir a tus padres que lo examinen si quieres.

**Firma del Participante:** sé que puedo elegir participar en la investigación o no hacerlo. Sé que puedo retirarme cuando quiera. Me han leído la información y la entiendo. Me han respondido las preguntas y sé que puedo hacer preguntas más tarde si las tengo. Entiendo que cualquier cambio se discutirá conmigo. Acepto participar en la investigación.



\_\_\_\_\_  
Nombre del niño o niña y huella si no sabe firmar  
Dirección

\_\_\_\_\_  
Firma y CC de representante legal

\_\_\_\_\_  
Firma y CC del testigo 1  
Dirección


\_\_\_\_\_  
Firma y CC del testigo 2  
Dirección

\_\_\_\_\_  
Firma y CC del investigador

\_\_\_\_\_  
Fecha (día/mes/año)

Fuentes: Declaración de Helsinki 2002, Resolución 008430 de 1993 del Ministerio Nacional de Salud, Normas éticas internacionales para la investigación en humanos. Decreto 2378 de 2008.

### Anexo C3.3. Formulario de datos del individuo

 <p><b>UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA</b></p>	<p>Dinámica de las infecciones sub-microscópicas por Plasmodium spp. en una zona endémica para malaria en Colombia</p> <p><b>Cuestionario INDIVIDUAL</b></p>	<p><b>CONFIDENCIAL</b></p> <p>La información recolectada en este cuestionario es confidencial, anónima y sólo se utilizará con fines de investigación</p>
--	--	---

Fecha          Iniciales       Vivienda          Código

FIRMA DE QUIEN DILIGENCIA EL CUESTIONARIO	
FECHA Y FIRMA DE REVISIÓN	

#### VERIFICACIÓN DE CRITERIOS DE ELEGIBILIDAD

	SI	NO	
Menor de 2 años	1	2	Si alguna de las respuestas es SI invite al participante al estudio, pero unicamente tome una muestra de sangre capilar para gota gruesa y papel filtro. Diligencie todo el cuestionario individual y de hogar
Mujer gestante	1	2	
Consumo de antimaláricos en el último mes	1	2	
Consumo de antibióticos últimas dos semanas	1	2	

#### LUGAR DE CAPTACIÓN

Puesto de diagnóstico     Servicio de urgencias     Residencia     Trabajo     Otro

Departamento     Municipio

Corregimiento     Vereda/Barrio/Hospital

#### INFORMACIÓN PERSONAL DE CONTACTO

Nombre completo

Tipo de identificación    Cédula     Tarjeta de identidad     Registro civil     Otro

Número de identificación  de

Teléfonos de contacto

#### INFORMACIÓN DEMOGRÁFICA Y ECONÓMICA

Sexo    Masculino     Femenino

Grupo étnico    Blanco     Negro     Mestizo     Indígena     Otro

Fecha de nacimiento          Edad (años)

Lugar de nacimiento    Departamento     Municipio


Tipo de afiliación al Reg. salud    Subsidiado     Contributivo     No afiliado     Otro

Tiene SISBEN    Si     No     Clasificación en el SISBEN

Nombre de la EPS

Estado civil    Soltero     Casado-Unión libre     Separado     Viudo

Nivel educativo alcanzado    Preescolar-Jardín     Primaria incompleta     Primaria completa     Secundaria incompleta     Secundaria completa     Ed. Superior incompleta     Ed. Superior completa     Ninguno

 <b>UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA</b> 1903	Dinámica de las infecciones sub-microscópicas por Plasmodium spp. en una zona endémica para malaria en Colombia	<b>CONFIDENCIAL</b> La información recolectada en este cuestionario es confidencial, anónima y sólo se utilizará con fines de investigación
	<b>Cuestionario INDIVIDUAL</b>	

Fecha  d  m  a  a    Iniciales       Vivienda          Código

FIRMA DE QUIEN DILIGENCIA EL CUESTIONARIO	
FECHA Y FIRMA DE REVISIÓN	

**INFORMACIÓN SOBRE LUGAR DE RESIDENCIA Y DESPLAZAMIENTOS**

**Lugar de residencia**  
 Departamento     Municipio   
 Corregimiento     Vereda/Barrio

**Zona de residencia**  
 Rural  1    Casco urbano  2    Centro poblado  3

**Tiempo de residencia en la zona**  
 Años      Meses

¿En el último mes ha permanecido por mas de un día en otro lugar diferente a su residencia?  
 Si  1    No  2

**Lugar en el cual estuvo el último mes**  
 Departamento     Municipio   
 Corregimiento     Vereda/Barrio

**Zona en la que estuvo el último mes**  
 Rural  1    Casco urbano  2    Centro poblado  3

¿El lugar en el cual estuvo es zona endémica para malaria?  
 Si  1    No  2    No sabe  3

**INFORMACIÓN SOBRE OCUPACIÓN**

¿Cual es su ocupación actual?  
 Agricultor  1    Minero  2    Construcción/Oficios varios  3    Ama de casa  4  
 Estudiante  5    Comerciante  6    Pescador  7    Asistente administrativo  8  
 Ninguna  9    Otro  10    Cuál

Si señaló varias ocupaciones, señale su actividad:    Principal:     Secundaria:

**SOBRE LA OCUPACIÓN PRINCIPAL REGISTRE LOS SIGUIENTES DATOS**

**Lugar**  
 En el hogar y alrededores  1    Por fuera del hogar  2

**Horario**  
 Diurno  1    Nocturno  2

**Ambiente**  
 Al aire libre  1    En espacio cerrado  2

¿Desde hace cuanto tiempo tiene esta ocupación?  
 Entre 1 a 2 meses  1    Entre 3 a 6 meses  2    Entre 7 a 12 meses  3    Mas de un año  4  
 No recuerda  5    No aplica  6

¿Durante su jornada cuantas horas permanece al aire libre?

¿Existen depósitos de agua alrededor del lugar?  
 Si  1    No  2    No sabe  3

¿Que tipos de depósitos de agua existen?  
 Agua lluvia estancada/Chipal  1    Laguna, ciénaga  2    Quebrada-río  3    Tanque de agua  4  
 Otro  5    Mas de 1  6







**UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA**

Dinámica de las infecciones sub-microscópicas por Plasmodium spp. en una zona endémica para malaria en Colombia

**Cuestionario INDIVIDUAL**

**CONFIDENCIAL**  
La información recolectada en este cuestionario es confidencial, anónima y sólo se utilizará con fines de investigación

Fecha  d  d  m  m  a  a Iniciales    Vivienda       Código

FIRMA DE QUIEN DILIGENCIA EL CUESTIONARIO

FECHA Y FIRMA DE REVISIÓN

¿Usted lava su toldillo? Si  1 No  2

¿Con que frecuencia lava el toldillo? Una vez a la semana  1 Una vez al mes  2 Cada 2 meses  3 Cada 3 a 6 meses  4  
Dos veces al año  5 Una vez al año  6 Cada dos años  7 Cuando está nuevo  8

¿Usted usa repelente? Si  1 No  2

¿Usted usa baños con plantas para prevenir la malaria? Si  1 No  2

¿Usted toma antimaláricos para prevenir la malaria? Si  1 No  2

**EVALUACIÓN CLÍNICA**

Temperatura axilar    °C


En las últimas 48 horas ha tenido:

Fiebre Si  1 No  2 Tipo de fiebre Diaria  1 Cada 2 días  2 Cada 3 días  3 Irregular  4

	SI	NO		SI	NO		SI	NO
Cefalea	<input type="text"/> 1	<input type="text"/> 2	Vómito	<input type="text"/> 1	<input type="text"/> 2	Tos	<input type="text"/> 1	<input type="text"/> 2
Escalofríos	<input type="text"/> 1	<input type="text"/> 2	Diarrea	<input type="text"/> 1	<input type="text"/> 2	Sangrados	<input type="text"/> 1	<input type="text"/> 2
Sudoración	<input type="text"/> 1	<input type="text"/> 2	Brote en la piel	<input type="text"/> 1	<input type="text"/> 2	Adinamia, debilidad	<input type="text"/> 1	<input type="text"/> 2
Dolor osteomuscular	<input type="text"/> 1	<input type="text"/> 2	Prurito	<input type="text"/> 1	<input type="text"/> 2	Anorexia	<input type="text"/> 1	<input type="text"/> 2
Dolor abdominal	<input type="text"/> 1	<input type="text"/> 2	Dolor faríngeo	<input type="text"/> 1	<input type="text"/> 2	Orina roja, naranja o café	<input type="text"/> 1	<input type="text"/> 2
Náuseas	<input type="text"/> 1	<input type="text"/> 2	Dificultad para respirar	<input type="text"/> 1	<input type="text"/> 2	Ictericia	<input type="text"/> 1	<input type="text"/> 2
Palidez	<input type="text"/> 1	<input type="text"/> 2	Mareos	<input type="text"/> 1	<input type="text"/> 2	Delirio, letargia, somnolencia	<input type="text"/> 1	<input type="text"/> 2

Le han diagnosticado alguna de las siguientes enfermedades en el último año :

	SI	NO		SI	NO		SI	NO
Diabetes	<input type="text"/> 1	<input type="text"/> 2	Leptospirosis	<input type="text"/> 1	<input type="text"/> 2	Parasitosis intestinal	<input type="text"/> 1	<input type="text"/> 2
Enfermedades autoinmunes	<input type="text"/> 1	<input type="text"/> 2	Dengue/Zika/Chicunguya	<input type="text"/> 1	<input type="text"/> 2	Hepatitis	<input type="text"/> 1	<input type="text"/> 2
Insuficiencia renal	<input type="text"/> 1	<input type="text"/> 2	Fiebre tifoidea	<input type="text"/> 1	<input type="text"/> 2	Otra	<input type="text"/> 1	<input type="text"/> 2
Insuficiencia hepática	<input type="text"/> 1	<input type="text"/> 2	VIH	<input type="text"/> 1	<input type="text"/> 2	Cuál	<input type="text"/>	
Alteraciones de tiroides	<input type="text"/> 1	<input type="text"/> 2	Tuberculosis	<input type="text"/> 1	<input type="text"/> 2			

 <b>UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA</b> 1903	Dinámica de las infecciones sub-microscópicas por Plasmodium spp. en una zona endémica para malaria en Colombia	<b>CONFIDENCIAL</b> La información recolectada en este cuestionario es confidencial, anónima y sólo se utilizará con fines de investigación
	<b>Cuestionario INDIVIDUAL</b>	

Fecha  d  d  m  m  a  a   
 Iniciales       
 Vivienda           
 Código

FIRMA DE QUIEN DILIGENCIA EL CUESTIONARIO	
FECHA Y FIRMA DE REVISIÓN	

**RESULTADOS DE LABORATORIO**

Hora de toma de muestra venosa  H  H  M  M   
 Hora de separación del plasma  H  H  M  M

Aspecto del plasma    Hemolizado  1    No hemolizado  2

Hemoglobina (Hemocue, g/dL)

**Gota gruesa bacteriologo proyecto**

Tipo de muestra    Capilar  1    Venosa  2    Tipo de anticoagulante \_\_\_\_\_

Resultado especie    *P. vivax*  1    *P. falciparum*  2    Mixta  3    Negativo  4

Recuento (parásitos/uL)    Total \_\_\_\_\_    Asexuados \_\_\_\_\_    Sexuados \_\_\_\_\_

**LAMP EN CAMPO**

Resultado para Género    Positivo  1    Negativo  2    No realizado  3

Resultado para especie    *P. vivax*  1    *P. falciparum*  2    *P. malariae*  3    Otra especie  4

**PCR en Medellín**

Resultado para género    Positivo  1    Negativo  2

Resultado para especie    *P. vivax*  1    *P. falciparum*  2    *P. malariae*  3    Otra especie  4


**CLASIFICACIÓN DEL PARTICIPANTE**

Gota gruesa positiva y síntomas (NO seguimiento)  1

Gota gruesa negativa y PCR LAMP positiva (Formulario de seguimiento 3)  4

Gota gruesa positiva *asintomático* i ingresa a seguimiento (Formulario de seguimiento 1)  2

### Anexo C3.4. Formulario de datos de la vivienda

 <b>UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA</b> 1803	Dinámica de las infecciones sub-microscópicas por Plasmodium spp. en una zona endémica para malaria en Colombia	<b>CONFIDENCIAL</b> La información recolectada en este cuestionario es confidencial, anónima y sólo se utilizará con fines de investigación
	<b>CUESTIONARIO VIVIENDA</b>	

Fecha

Vivienda

FIRMA DE QUIEN DILIGENCIA EL CUESTIONARIO	
FECHA Y FIRMA DE REVISIÓN	

**INFORMACIÓN GENERAL**

Ubicación de la vivienda

Departamento	<input type="text"/>	Municipio	<input type="text"/>
Corregimiento	<input type="text"/>	Vereda/Barrio	<input type="text"/>

Zona de residencia

Rural       Casco urbano       Centro poblado

Dirección (indicaciones)

Número de habitantes en la vivienda

Tipo de familia


Nuclear       Extendida       Monoparental       Otra

Relacione a continuación cada uno de los habitantes de la vivienda (SOLO si el participante fue captado en vereda)

Primer nombre	Primer apellido	Sexo		Edad	Meses /años	Gestante		Ingreso al estudio		Código en el estudio				Jefe de hogar	
		M	F			Si	No	Si	No					Si	No
*		1	2			1	2	1	2					1	2
		1	2			1	2	1	2					1	2
		1	2			1	2	1	2					1	2
		1	2			1	2	1	2					1	2
		1	2			1	2	1	2					1	2
		1	2			1	2	1	2					1	2
		1	2			1	2	1	2					1	2
		1	2			1	2	1	2					1	2
		1	2			1	2	1	2					1	2

\*Persona quien da la información para este cuestionario



 <b>UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA</b> 1803	Dinámica de las infecciones sub-microscópicas por Plasmodium spp. en una zona endémica para malaria en Colombia  <b>CUESTIONARIO VIVIENDA</b>	<b>CONFIDENCIAL</b> La información recolectada en este cuestionario es confidencial, anónima y sólo se utilizará con fines de investigación
---	---	--

 Fecha  d  d  m  m  a  a

 Vivienda    

FIRMA DE QUIEN DILIGENCIA EL CUESTIONARIO	
FECHA Y FIRMA DE REVISIÓN	

**INFORMACIÓN SOBRE LUGAR DE RESIDENCIA**

**Tenencia de vivienda familiar** Propia  1 Arrendada  2 Prestada  3 Invasión  4

**Otras propiedades de la familia** Moto  1 Vehículo  2 Tierra  3 Edad comercial  4  
 Ganado  5 Otro  6 Ninguno  7

**Tienen servicio de luz** Si  1 No  2

**Tienen servicio de agua** Si  1 No  2

**Tienen servicio de alcantarillado** Si  1 No  2

**Tienen servicio de recolección de basuras** Si  1 No  2

**Material predominante en los techos** Palma/otro vegetal  1 Teja o barro  2 Zinc-Latas  3 Plástico  4  
 Loza-Cemento  5 Otro  6

**Material predominante en las paredes** Guadua-otro vegetal  1 Madera  2 Zinc-Latas  3 dobe-Cemento  4  
 Tapia/Bahareque  5 Plástico  6 Otro  7

**Material predominante en los pisos** Tierra-arena  1 Guadua-otro vegetal  2 Madera  3 dobe-Cemento  4  
 Baldosa-cerámica  5 Otro  6


**De donde obtienen el agua para beber y cocinar** Arroyo-quebrada-río  1 Pozo  2 Carrotanque  3 Agua lluvia  4  
 Acueducto  5 Otro  6

**Que tipos de depósitos de agua existen alrededor de la vivienda** Laguna, ciénaga  1 Agua lluvia estancada/Chipal  2 Quebrada-río  3 anque de agua  4  
 Otro  5 Ninguno  6

**Distancia a la laguna, cienaga, quebrada o río (metros)** \_\_\_\_\_

**Tipo de transporte utilizado para ir al puesto de malaria** Carro  1 Moto  2 Bicicleta  3 A pie  4 Otro  5

**Tiempo en minutos al puesto de malaria** \_\_\_\_\_

 <p><b>UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA</b></p>	<p>Dinámica de las infecciones sub-microscópicas por Plasmodium spp. en una zona endémica para malaria en Colombia</p> <p><b>CUESTIONARIO VIVIENDA</b></p>	<p><b>CONFIDENCIAL</b> La información recolectada en este cuestionario es confidencial, anónima y sólo se utilizará con fines de investigación</p>
--	--	--

Fecha  d  d  m  m  a  a

Vivienda

FIRMA DE QUIEN DILIGENCIA EL CUESTIONARIO	
FECHA Y FIRMA DE REVISIÓN	

Distancia desde la casa al puesto de malaria < 1Km  1      1 - 2,5 Km  2      2,6 - 3,5Km  3      ≥3,6Km  4

Costo del transporte hasta el puesto de salud (en pesos colombianos)

Presencia de animales domesticos en la vivienda Si  1      No  2

Tipo de animal domestico Perro  1      Gato  2      Ganado vacuno  3      Ganado porcino  4  
Aves de corral  5      Otros  6

Nro. animales permanecen al interior de la vivienda

**MEDIDAS DE PREVENCIÓN PARA MALARIA**

Los funcionarios del programa de malaria han fumigado su casa? Si  1      No  2      No aplica  3

Quando fue la última vez que los funcionarios del programa de malaria fumigaron su casa? Menos de 1 mes  1      Entre 1 y 3 meses  2      Entre 3 y 6 meses  3      ≥ 6 y 12 meses  4  
Entre 1 y 2 años  5      Mas de 2 años  6      No recuerda  7      Nunca  8

Usa insecticidas propios para fumigar su vivienda Si  1      No  2      No aplica  3

Usa angeo en ventanas? Si  1      No  2      No aplica  3

Drena aguas estancadas cercanas a la vivienda? Si  1      No  2      No aplica  3

Usted siembra plantas repelentes cerca a la vivienda? Si  1      No  2      No aplica  3

Usted utiliza peces o insectos en los depósitos de agua para prevenir la formación de larvas? Si  1      No  2      No aplica  3

## Anexo C3.5. Manual de procedimientos en Campo

**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS:** Dinámica de las infecciones submicroscópicas por *Plasmodium* spp. en una zona endémica para malaria en Colombia

### **MANUAL DE PROCEDIMIENTOS**

Dinámica de las infecciones submicroscópicas por *Plasmodium* spp. en una zona endémica para malaria en Colombia

**Versión agosto 09 de 2017**

**Elaboró: Jehidys Montiel Ramos, Lina Zuluaga Idárraga, Luisa Fernanda Carbal**

#### **INSTITUCIONES PARTICIPANTES**

- Universidad de Antioquia (UdeA)
- Instituto Departamental de Salud de Nariño (IDSN)

#### **INVESTIGADORES**

<b>Universidad Antioquia</b>	<b>de</b>	<b>Instituto Departamental de Salud de Nariño</b>
Alberto Tobón Castaño		Bibiana Mena Criollo
Ana María Vásquez		Pilar Pérez Cortes
Daniel Camilo Aguirre		
Lina Zuluaga Idárraga		
Jehidys Montiel Ramos		

## 1. DESCRIPCIÓN GENERAL

**Entidad Financiadora:** Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (Colciencias) y Universidad de Antioquia

**Objetivo General:** Evaluar el comportamiento en el tiempo de las infecciones submicroscópicas por *Plasmodium* spp. en dos meses de seguimiento y los factores del hospedero y del parásito asociados a su persistencia en una zona endémica para malaria en Colombia

### Objetivos Específicos

- Describir las características clínicas, socio-demográficas y los antecedentes de malaria de sujetos con infección submicroscópica por *Plasmodium* spp. en una zona endémica para malaria en Colombia
- Caracterizar las infecciones submicroscópicas por *Plasmodium* spp. según especie, genotipo y presencia de gametocitos maduros
- Describir el comportamiento en el tiempo de las infecciones submicroscópicas por *Plasmodium* spp. en dos meses de seguimiento
- Determinar la relación del nivel anticuerpos IgG e IgM, edad, antecedentes de malaria y tiempo de residencia en zona endémica con la persistencia de las infecciones submicroscópicas por *Plasmodium* spp
- Determinar la relación de la multiplicidad de infección y presencia de gametocitos maduros con la persistencia de las infecciones submicroscópicas por *Plasmodium* spp.

### Metodología

Este estudio se llevara a cabo en dos fases; una fase inicial en la que se identificaran los participantes con infección submicroscópica por *Plasmodium* spp. a través de un etapa transversal y posteriormente una fase longitudinal prospectiva en la que los participantes con infección submicroscópica serán seguidos por un período de dos meses con un total de 6 mediciones para evaluar el desarrollo de síntomas o positividad de la gota gruesa; eliminación de la parasitemia o persistencia de la infección.

## 2. EQUIPO DE INVESTIGACIÓN

El equipo de investigación está conformado por investigadores de grupos de investigación con reconocida trayectoria. Se contará además con la participación de personal altamente calificado y adecuada infraestructura de laboratorios de referencia.

**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS:** Dinámica de las infecciones submicroscópicas por *Plasmodium* spp. en una zona endémica para malaria en Colombia

Se cuenta con dos laboratorios de referencia, el Grupo Malaria y la Unidad de Control de Vectores (UCV). La *tabla 1* detalla los investigadores y las funciones:

**Tabla 1.** Funciones de participantes de los proyectos

Nombre	Institución	Rol en el proyecto	Funciones	Información de contacto
Alberto Tobón	Grupo Malaria, UdeA	Investigador principal	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Coordinación general de la ejecución financiera y técnica del proyecto</li> <li>- Preparación de manuscritos e informes</li> <li>- Tutoría del estudiante de maestría</li> </ul>	alberto.tobon1@udea.edu.co Cel. 3007780438 Tel. 2196486 Calle 62 N 52-59 lab 610
Ana M. Vásquez	Grupo Malaria, UdeA	Coinvestigador	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diseño experimental, análisis de datos, elaboración de informes y manuscritos</li> </ul>	amaría.vasquez@udea.edu.co Cel. 3006297410 Tel. 2196585 Calle 62 N 52-59 lab 610
Daniel C. Aguirre	Instituto de Investigaciones Médicas	Coinvestigador	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diseño metodológico, análisis estadístico, redacción científica de informes y artículos</li> </ul>	daniel.aguirre@udea.edu.co Cel.3042415588 Tel. 2196098 Calle 51D#62-29

**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS:** Dinámica de las infecciones submicroscópicas por *Plasmodium* spp. en una zona endémica para malaria en Colombia

Lina Zuluaga	Grupo Malaria, UdeA	Coinvestigador	- Control de calidad del dato, análisis de resultados, elaboración de artículos	Lina.zuluaga@udea.edu.co Cel. 3127231776 Tel. 2196852 Calle Cl 62 #52-59
Jehidys Montiel	Grupo Malaria, UdeA	Coinvestigador	- Coordinación del trabajo de campo - Diseño del manual de procedimientos y cuestionarios y organización del cronograma del seguimiento de los participantes - Análisis de resultados, elaboración de artículos	Jehidys.montiel@udea.edu.co Cel. 3116485861 Tel. 2196585 Calle 62 N 52-59 lab 610
Bibiana Mena Criollo	IDSN	Coinvestigador	- Apoyo coordinación trabajo de campo y elaboración de informes, devolución de resultados a las autoridades Competentes	saludpublicaidsn@gmail.com Tel.(032) 723 5428 IDSN- San Juan de Pasto Calle 15 # 28-41

**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS:** Dinámica de las infecciones submicroscópicas por *Plasmodium* spp. en una zona endémica para malaria en Colombia

Pilar Pérez Cortes	IDSN	Coinvestigador	- Coordinadora del Equipo de ETV que trabaja en el proyecto	pilarperez37@gmail.com Tel 3155841892 Unidad de Control de Vectores-Tumaco
Iveth Jimena González Jiménez	FIND Foundation for Innovative New Diagnostics	Asesora Internacional	Soporte científico técnico en la implementación de LAMP	iveth.gonzalez@finddx.org
Juan C. Pérez	Grupo Malaria, UdeA	Estudiante de Maestría.	- Desarrollo de las pruebas moleculares - análisis de datos y presentación de resultados	juan.perez55@hotmail.com Cel. 3218033306 Tel. 2196585 Calle 62 N 52-59 lab 610
Flor Portocarrero	Grupo Malaria, IDSN	Auxiliar de campo	Captación de pacientes en campo en los 4 estudios transversales, procesamiento de las muestras captadas y envío de materiales	e-mail: floreliportocarrero@hotmail.com Cel. 3175831299 Dir. Unidad de Control de

**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS:** Dinámica de las infecciones submicroscópicas por *Plasmodium* spp. en una zona endémica para malaria en Colombia

Zully Toloza	Grupo Malaria, IDSN	Auxiliar de campo	aptación de pacientes en campo en los 4 estudios transversales, procesamiento de las muestras captadas y envío de materiales	e-mail: zullyesthertoloza@gmail.com Cel. 3166549664 Dir. Unidad de Control
Claudia Rivera	IDSN	Bacterióloga	Lectura de gotas gruesas y ejecución en campo de prueba de LAMP en los estudios transversales y en el seguimiento a los participantes con infección submicroscópica	crivera@idsn.gov.co Cel. 3148257595 Unidad de Control de Vectores-Tumaco
Luisa Carbal	Grupo Malaria, UdeA	Microbiólogo Medellín	- Extracción de DNA del parásito - Diagnóstico molecular de malaria - Envío de material a los sitios de campo - Apoyo a estudiantes en formación	luisacarbal@gmail.com Cel. 3013451950 Calle 62 N 52-59 lab 610
Rigoberto Erazo Fernández	IDSN	Personal de Apoyo	Control de calidad, Dx malaria y análisis de resultados	rigobertoerazo@hotmail.com Cel. (032) 727 18 17 Dir. Unidad de Control de Vectores



**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS:** Dinámica de las infecciones submicroscópicas por *Plasmodium* spp. en una zona endémica para malaria en Colombia

Flavio Castillo Cuero	IDSN	Personal de Apoyo	Apoyo a trabajo de campo, toma de muestra y seguimiento de pacientes	fcastillo5859@hotmail.com m Cel. (032) 727 18 17 Dir. Unidad de Control de Vectores
-----------------------	------	-------------------	--	--

### 3. LUGAR DEL ESTUDIO

El estudio se realizará en el municipio de Tumaco en el departamento de Nariño, todas las zonas son endémicas para malaria.

La captación de los participantes se hará en un barrio y tres corregimientos del municipio. En la *tabla 2* se presentan los lugares seleccionados y la zona, que cumplieron con los siguientes requisitos: presencia de casos de malaria en el último año, distancia al casco urbano en moto menor o igual a una hora y media y factibilidad para realizar el trabajo de campo.

**Tabla 2.** Lugares seleccionados para la captación de los participantes

Lugar	Zona
California	Urbana
Candelillas	Rural
Robles	Rural
Tangareal	Rural

En la UCV se instalará el puesto centinela, en este lugar se tendrá todo el material necesario para el trabajo de campo, se realizarán todas las pruebas de laboratorio, se almacenará temporalmente las muestras recolectadas y se coordinarán los envíos hacia el laboratorio de referencia en Medellín. Todo el personal contratado ubicado en el municipio de Tumaco deberá velar porque el laboratorio permanezca en las condiciones óptimas para el trabajo.

### 4. DEFINICIONES

Se tendrán en cuenta las siguientes definiciones:

#### 4.1. Infección submicroscópica afebril

**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS:** Dinámica de las infecciones submicroscópicas por *Plasmodium* spp. en una zona endémica para malaria en Colombia

Paciente con parasitemia por *Plasmodium* spp. detectada por LAMP-PCR, gota gruesa negativa y con temperatura axilar  $\leq 37,5^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.2. Infección microscópica febril**

Participante con gota gruesa positiva para *Plasmodium* spp. y temperatura axilar  $>37,5^{\circ}$  (*esto es un caso de malaria o paludismo*)

#### **4.3. Infección microscópica afebril**

Participante con gota gruesa positiva para *Plasmodium* spp. y temperatura axilar  $<37,5^{\circ}$  en ausencia de otros síntomas asociados a malaria

### **5. TAMAÑO DE MUESTRA**

El tamaño de muestra estimado son 1500 participantes distribuidos en los 4 sitios especificados en la tabla 2. Se tratará de seleccionar por sitio una muestra aproximada de 375 participantes. La selección de los sectores se hará con el acompañamiento del personal de la UCV quienes conocen cuales son las zonas con la mayor problemática de malaria en los lugares seleccionados.

### **6. CAPTACIÓN DE PARTICIPANTES**

Ver **Flujograma 1. Captación de participantes asintomáticos y submicroscópicos**

#### **6.1. Día cero (día de ingreso al estudio)**

El auxiliar en campo registrará en el formato de registro de participantes las personas que se visitarán por cada día de trabajo. El auxiliar de campo visitará a todas las viviendas de las áreas seleccionadas. En caso de que alguno de los participantes no se encuentre en su vivienda al momento de la visita, se programará al menos una segunda y tercera visita.

Durante la visita se deben seguir los siguientes pasos:

##### **6.1.1. Saludo y presentación**

##### **6.1.2. Descripción del estudio y explicación sobre la selección al azar del individuo**

##### **6.1.3. Verificación de los siguientes criterios de elegibilidad:**

- Mayor de 2 años
- No gestante
- Sin diagnóstico de malaria y/o ingesta de antimaláricos 4 semanas previas.
- No consumo de antibióticos en las últimas 2 semanas.

**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS:** Dinámica de las infecciones submicroscópicas por *Plasmodium* spp. en una zona endémica para malaria en Colombia

Si el participante **NO CUMPLE** con alguno de estos criterios, infórmele las razones por las cuales se le tomará **PUNCIÓN CAPILAR**

Si el participante **CUMPLE** con todos los criterios de elegibilidad, infórmele sobre el procedimiento de toma de muestra por **PUNCIÓN VENOSA** (ver procedimientos sección 7.2), diligenciamiento de cuestionario y posibles visitas de seguimiento.

**6.1.4.** Invitación a participar del estudio y diligenciamiento del consentimiento/asentimiento informado, para esto tenga en cuenta los siguientes criterios (**Flujograma 1**):

- **Menores con menos de 7 años:** consentimiento del padre o acudiente (formato de consentimiento)
- **Menores entre 7 y 17 años:** asentimiento del menor y consentimiento del padre o acudiente (formatos de consentimientos)
- **Mayor de 18 años:** Consentimiento del participante (formato de consentimiento)

Si el individuo no acepta participar del estudio, agradezca el tiempo brindado y registre en el formato de ingreso de participantes la no inclusión y la causa (en la columna de observaciones). Si el individuo acepta participar proceda con la asignación del código.

**6.1.5. Asignación de código para participantes:** cada participante tendrá un código único en el estudio con el cual se identificarán las muestras y los formatos para garantizar la confidencialidad de la información. Este código consta de 6 dígitos así:

- El primer dígito corresponde al departamento: 3
- El segundo dígito corresponde al proyecto: en este caso todos tendrán el número 2.
- El tercer, cuarto y quinto y sexto dígito corresponde al consecutivo de inclusión al estudio. El auxiliar de campo # 1 iniciará en 0001 hasta el 0999, el auxiliar de campo # 2 iniciará en 1000 hasta 1999 y el auxiliar de campo # 3 iniciará en 2000 hasta 2999.

Ejemplo:

- El primer participante incluido por Flor Portocarrero será **320001**, mientras que el último será **320999**
- El primer participante incluido por Zully Toloza será **321000**, mientras que el último será **321999**
- El primer participante incluido por Jacqueline Escobar será **322000**, mientras que el último será **3212999**

#### **6.1.6. Diligenciamiento de cuestionario individual**

Tenga en cuenta la siguiente información sobre algunas aclaraciones para el diligenciamiento:

- Lea cada una de las preguntas al participante y tenga cuidado de no inducir las respuestas. Registre la respuesta de acuerdo a las opciones del cuestionario y no deje ninguna pregunta sin responder.
- En la sección de encabezado considere:
  - o *Fecha*: Corresponde a la fecha de ingreso del participante al estudio, en formato dd/mm/aa.
  - o *Iniciales*: Corresponde a las iniciales del participante (3 letras), inicial del primer nombre, inicial del primer apellido e inicial del segundo apellido.
  - o *Vivienda*: Corresponde al código de la vivienda asignado en el censo, esta información debe ser suministrada por el auxiliar de campo en el puesto centinela en Tumaco en el formato entregado al auxiliar para las visitas de captación.
  - o *Código*: el asignado a cada participante en el estudio como se describió anteriormente
  - o *Firma de quien diligencia el cuestionario*: En este espacio debe firmar el auxiliar de campo una vez verifique que la información de cada hoja está completa
  - o *Fecha y firma de revisión*: En este espacio el auxiliar de campo en el puesto centinela en Tumaco debe registrar la información una vez verifique que la información entregada por el auxiliar de campo está completa. En caso de encontrar información faltante el el auxiliar de campo en el puesto centinela en Tumaco devolverá el cuestionario al auxiliar.
- En la sección de verificación de criterios de elegibilidad: Marque con una X en la casilla Sí o No para el cumplimiento de cada criterio.
- En la sección de lugar de captación:
  - o Escriba el departamento, municipio y corregimiento (si aplica) y vereda.
- En la sección de lugar de residencia y desplazamiento, para clasificar la zona de residencia considere las siguientes definiciones del DANE:
  - o *Rural*: se caracteriza por la disposición dispersa de viviendas y explotaciones agropecuarias existentes en ella. No cuenta con un trazado o nomenclatura de calles, carreteras, avenidas, y demás. Tampoco dispone, por lo general, de servicios públicos y otro tipo de facilidades propias de las áreas urbanas.

**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS:** Dinámica de las infecciones submicroscópicas por *Plasmodium* spp. en una zona endémica para malaria en Colombia

- o *Casco urbano*: es el área geográfica que está definida por un perímetro urbano, cuyos límites se establecen por acuerdos del Concejo Municipal. Corresponde al lugar en donde se ubica la sede administrativa de un municipio.
  - o *Centro poblado*: es un concepto creado por el DANE para fines estadísticos, útil para la identificación de núcleos de población. Se define como una concentración de mínimo veinte (20) viviendas contiguas, vecinas o adosadas entre sí, ubicada en el área rural de un municipio o de un Corregimiento Departamental. Dicha concentración presenta características urbanas tales como la delimitación de vías vehiculares y peatonales.
- Las secciones de resultados de laboratorio y clasificación del participante deben ser exclusivamente diligenciadas por el auxiliar de campo en el puesto centinela en Tumaco

#### **6.1.7. Diligenciamiento de cuestionario de vivienda**

Tenga en cuenta la información sobre aclaraciones del cuestionario individual.

El código asignado a cada vivienda tendrá 5 dígitos y se hará de la siguiente manera:

- El primer dígito corresponde al departamento: 3
- El segundo dígito corresponde al proyecto: en este caso todos tendrán el número 2.
- El tercer, cuarto y quinto dígito corresponde al consecutivo durante el censo: El auxiliar de campo # 1 iniciará en 001 hasta el 333, el auxiliar de campo # 2 iniciará en 334 hasta 666 y el auxiliar de campo # 3 iniciará en 667 hasta 999.

Ejemplo:

- La primera vivienda incluida por Flor Portocarrero será **32001**, mientras que la última será **32333**
- La primera vivienda incluida por Zully Toloza será **32333**, mientras que la última será **32666**
- La primera vivienda incluida por Jacqueline Escobar será **32667**, mientras que la última será **32999**

#### **6.1.8. Toma de temperatura** (ver procedimientos 7.1).

**6.1.9. Toma de muestra:** si el participante cumple criterios de inclusión y desea participar, tomar muestra venosa y si no cumple, tomar muestra capilar. Si el participante desea participar pero no le gusta la punción venosa, tomarle sólo capilar.

**6.1.10.** Dar las gracias al participante por su tiempo

**6.2. Seguimiento de los participantes (Flujograma 3)**

De acuerdo a las definiciones establecidas para este estudio se tomarán decisiones con relación a la inclusión de los participantes en el seguimiento, esto a su vez definirá la remisión del participante al puesto de diagnóstico para la administración de medicamento.

Para la inclusión al seguimiento se considerarán los siguientes criterios:

- Resultado de Gota Gruesa.
- Resultado de LAMP/PCR.
- Temperatura axilar.

Con los resultados de la gota gruesa y temperatura axilar obtenidos en cada uno de los días de seguimiento se deben tomar las decisiones sobre modificar el seguimiento y sobre el tratamiento, para esto debe tener en cuenta las mismas decisiones que se indicaron para el momento de ingreso al estudio ( **Flujograma 3. Seguimientos participantes y formatos de seguimiento**)

El tratamiento de los participantes no será suministrado directamente por los proyectos de investigación. Una vez el auxiliar de campo en el puesto centinela en Tumaco detecta algún participante que requiera tratamiento, deberá informar al microscopista del puesto de malaria o al personal responsable en el puesto de salud u hospital, ellos serán los responsables de entregar el medicamento al participante. El auxiliar de campo en el puesto centinela en Tumaco deberá verificar que el participante reciba el tratamiento adecuado y reciba atención médica si así lo requiere.

## 7. PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO

Ver Flujograma 2

### 7.1. Toma de temperatura axilar

#### Materiales

- Termómetro clínico de mercurio.

#### Procedimiento

- Comprobar que el termómetro esté por debajo de 35°C: sostener el termómetro por el extremo opuesto al del bulbo de mercurio y situarlo a la altura de los ojos. Si el nivel de la barra de mercurio está por encima de los 35° C, coger firmemente y, con movimientos secos de la muñeca, sacudir ligeramente hasta que baje el mercurio

**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS:** Dinámica de las infecciones submicroscópicas por *Plasmodium* spp. en una zona endémica para malaria en Colombia

- Explicar al paciente la técnica a realizar
- Comprobar que el pliegue axilar esté seco
- Colocar el termómetro bajo la axila, comprobando que el bulbo de mercurio esté en contacto con la piel
- Mantener en esta posición entre 3 a 5 minutos aproximadamente y proceder a su lectura.
- Escribir la cifra obtenida en la sección "Evaluación clínica" del formulario individual
- Bajar la columna de mercurio hasta 35°C y limpiar con alcohol
- Guardar termómetro

### **7.2. Punción venosa**

De cada paciente se obtendrá 1 tubo de sangre venosa con Heparina de 4mL.

#### Materiales

- Guantes
- Algodón
- Alcohol antiséptico
- Torniquete
- Camisa para venopunción
- Aguja para venopunción
- 1 tubo con anticoagulante Heparina
- Guardián de bioseguridad
- Marcador indeleble
- Cinta de enmascarar.
- Bolsas verdes y rojas.

#### Procedimiento:

- Preparar el material a utilizar y marcar adecuadamente el tubo con Heparina con el código de cada participante y la fecha.
- Colocarse los guantes y ubicar cómodamente al participante
- Escoger la vena y lugar apropiado para la venopunción
- Colocar el torniquete 15 a 20 cm de distancia al lugar de la venopunción.
- Palpar suavemente la vena con la yema de los dedos para identificar la dirección
- Desinfectar el punto de venopunción con algodón y alcohol
- Proceder a pinchar la vena y obtener el tubo de sangre
- Remover el torniquete, posteriormente el tubo con la muestra y por último la aguja. Colocar un algodón y hacer presión por algunos segundos.
- Retirar el material utilizado.

Mezcle por inversión el tubo de sangre

### **7.3. Punción capilar día cero**

A cada paciente se le realizaran dos 2 gotas gruesas y un papel de filtro.

#### Materiales

- Guantes
- Bata de laboratorio
- Algodón
- Alcohol antiséptico
- 2 Láminas portaobjetos nuevas, limpias.
- Papel de filtro #903 y 3
- Bolsa ziploc pequeña.
- Lancetas estériles
- Guardián de bioseguridad
- Marcador indeleble
- Cinta de enmascarar.
- Toallas de papel

#### Procedimiento:

- Preparar el material a utilizar y marcar adecuadamente las láminas portaobjeto, papel de filtro y bolsa con las iniciales, el código de cada participante y la fecha. Ubicar el papel de filtro sobre una toalla de papel recortada de aproximadamente las mismas dimensiones del papel de filtro.
- Colocarse los guantes y ubicar cómodamente al participante.
- Escoger el dedo para la punción (dedo índice o medio) y realizar asepsia de la zona con alcohol y algodón.
- Realizar presión en el dedo, con ayuda de una lanceta estéril realizar una punción rápida y firme en el borde de la yema del dedo.
- Realizar presión para favorecer la salida de sangre y limpiar la primera gota.
- Empezar a elaborar las dos láminas de gota gruesa a partir de la segunda gota de sangre.
- Presionar el dedo para favorecer la salida de sangre hasta obtener una gota grande y globosa.
- Se coloca la lámina portaobjeto por encima de la gota de sangre evitando tocar la incisión hecha con la lanceta, sirviendo dos gotas de sangre por cada lámina.
- Ayudado con otra lámina portaobjeto extender la muestra de sangre logrando un área aproximada de 1 cm x 1cm o de 1 cm x 1,5 cm. La muestra debe quedar homogénea (se recomienda hacer movimientos de vaivén)



**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS:** Dinámica de las infecciones submicroscópicas por *Plasmodium* spp. en una zona endémica para malaria en Colombia

- Dejar secar la muestra a temperatura ambiente por 20 minutos antes de ser coloreadas.
- Presionar el dedo para favorecer la salida de sangre para servirla en el papel de filtro procurando llenar los círculos por completo. Esperar al menos cinco minutos antes de guardar el papel de filtro en su bolsa.

#### **7.4. Coloración Giemsa y lectura**

Preparación se hará a partir de sangre anticoagulada, tomando con una pipeta Pasteur dos gotas de sangre por cada lámina y extendiéndolas como se describió anteriormente.

##### Materiales

- Solución Giemsa
- Agua estéril
- Micropipeta
- Puntas sin filtro 200uL
- Lámina cóncava
- Papel absorbente
- Tubo graduado
- Microscopio
- Aceite de inmersión
- Contador de células
- Recipiente descartar puntas
- 2 láminas portaobjetos con la muestra (cada una con dos retículos).

##### Procedimiento

Con las muestras elaboradas a partir de sangre anti-coagulada es necesario tener un especial cuidado en el secado (hasta por 24 horas para evitar que se corran).

Se recomienda que después de secar la muestra a temperatura ambiente, la lámina sea sometida a calor suave (37 °C) por un tiempo de 1 minuto y posteriormente dejarla enfriar antes de ser coloreada.

Preparar la solución para tinción inmediatamente antes de colorear la gota gruesa.

Determinar el volumen de tinción diluida al 3% (v/v) que se preparará a partir de la siguiente tabla:

**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS:** Dinámica de las infecciones submicroscópicas por *Plasmodium* spp. en una zona endémica para malaria en Colombia

Tabla. Preparación de la solución de trabajo del colorante Giemsa

<b>Número de láminas</b>	<b>Solución stock de Giemsa (uL)</b>	<b>Volumen final, agua tamponada pH7.2 (mL)</b>
<b>1</b>	150	5
<b>2-3</b>	300	10
<b>4-6</b>	600	20
<b>10</b>	1.000	30
<b>N</b>	90 x N	3 x N

- Transferir el agua tamponada (aproximadamente la mitad del volumen final) a un tubo de medición.
- Añadir el volumen apropiado del stock de la solución de coloración. Complete el volumen hasta el nivel determinado de la tabla anterior.

Nota: Asegúrese de que sólo las pipetas secas entren en contacto con la coloración de Giemsa, ya que cualquier humedad introducida acelerará el deterioro de la coloración. Para asegurar diluciones precisas, los volúmenes de la coloración Giemsa se deben medir usando micropipetas o pipetas serológicas de 1-2 ml con ayuda de pipeteador.

- Teñir las láminas de gota gruesa por 30 minutos, ubicándolas en la lámina cóncava de forma tal que el lado donde se ubica la muestra quede en contacto con el colorante.
- Para realizar la lectura de la gota gruesa, escoger campos con 10-20 leucocitos, desplace el carro del microscopio buscando identificar formas parasitarias. Si existen parásitos en la gota gruesa, identificar la especie.
- Realizar recuento de formas parasitarias en las gotas gruesas positivas, contando en campos óptimos el número de leucocitos y el número de parásitos observados, hasta alcanzar un recuento de leucocitos de 200.
- Calcular el recuento usando la siguiente fórmula; que asume un promedio de 8000 leucocitos por  $\mu\text{L}$  de sangre.

$$\# \text{ de parásitos}/\mu\text{L de sangre} = \frac{\# \text{ parásitos} \times 8000 \text{ leucocitos}/\mu\text{L de sangre}}{200 \text{ leucocitos}}$$

- Se considera que la gota gruesa está negativa si al observar un mínimo de 200 campos microscópicos en 100X no se observa ningún parásito.

### **7.5. Medición de hemoglobina (Hemocue)**

La medición de los niveles de hemoglobina se hará a partir de la sangre venosa.

#### Materiales

- Guantes
- Bata de laboratorio
- Recipiente para descartar material biológico
- Una pipeta pasteur estéril
- Gradilla para tubos Vacutainer
- Hemocue.
- Cubetas Hemocue.
- Toallas de papel.
- Muestra de sangre venosa en tubos con Heparina

#### Procedimiento

- Tomar una cubeta Hemocue del contenedor.
- Encender el Hemocue (ON) y abrir el contenedor de la cubeta a la posición de carga.
- A partir de la sangre anti-coagulada, servir gotas de sangre en la cubeta del Hemocue en un proceso continuo hasta llenar la cubeta. Limpie el exceso de sangre en la parte externa de la cubeta.  
Nota: tener cuidado de que no se formen burbujas, si esto pasa, descartar cubeta y utilizar una nueva.
- Poner la cubeta en el contenedor. Poner el contenedor en la posición de medida.
- Tomar nota del valor de la hemoglobina (Dentro de los 10 minutos de lectura), anotando el resultado en el formato de resultados de Hemoglobina
- Retirar la cubeta del contenedor y descartar.
- Limpiar y apagar el Hemocue (OFF).

### **7.6. Conservación de muestra para obtención de mRNA**

#### Materiales

- Guantes
- Bata de laboratorio
- Marcador indeleble
- Recipiente para descartar material biológico
- Criovial con 250 $\mu$ L de RNA gard blood
- Gradilla para tubos Vacutainer
- Muestra de sangre venosa en tubos con EDTA
- Micropipeta de100 $\mu$ L

**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS:** Dinámica de las infecciones submicroscópicas por *Plasmodium* spp. en una zona endémica para malaria en Colombia

Procedimiento

- Marcar debidamente el criovial que contiene los 250µL de RNA gard blood con el código de la participante y la fecha de toma de la muestra.
- Con la micropipeta servir 100 de sangre en el criovial
- Mezclar suavemente
- Conservar refrigerado

**Nota:** los crioviales deben ser enviados a Medellín mensualmente para la conservación de la muestra a -80°C hasta su procesamiento para la detección de los gametocitos maduros

**7.7. Preparación del papel de filtro**

Para cada muestra se van a realizar **dos** papeles de filtro.

Materiales

- Guantes
- Bata de laboratorio
- Marcador indeleble
- Recipiente para descartar material biológico
- Papel de filtro Whatman 903 (5 círculos) y N°3 (2 círculos).
- Bolsa con cierre hermético para el almacenamiento individual del papel
- Una pipeta Pasteur estéril
- Gradilla para tubos Vacutainer
- Muestra de sangre venosa en tubos con Heparina.
- Toallas de papel.

Procedimiento

- Marcar debidamente los papeles filtro y la bolsa plástica con el código del participante y la fecha de toma de la muestra. Ubicar los papeles de filtro en una toalla de papel recortada con un tamaño similar.
- Con la pipeta Pasteur servir una gota de sangre en cada círculo de papel de filtro y verificar que cada uno quede lleno, si es necesario, continuar sirviendo otra gota de sangre a cada círculo hasta que los bordes queden llenos.
- Secar las muestras a temperatura ambiente por un periodo de 3 horas, no usar calor para ayudar al secado
- Colocar los papeles de filtro secos en una bolsa pequeña debidamente marcada y almacenar en un recipiente con silica gel.

### **7.8. Extracción de ADN para LAMP**

#### Materiales

- Micropipetas volumen 20-200 uL.
- Puntas sin filtro volumen hasta 200 uL.
- Formato de registro de resultados.
- Microcentrífuga para tubos de 1.5 mL.
- Bloque de calentamiento.
- Tubos de microcentrífuga con 345 uL de agua grado molecular.
- Gradilla para tubos Vacutainer y tubos de microcentrífuga.
- Buffer de extracción.
- Tubos Eppendorf con 345 uL de agua estéril (1 por muestra).
- Marcador indeleble.
- Guantes de látex.

#### Procedimiento

- Desinfectar el área de trabajo con alcohol.
- Rotular cada tubo con buffer de extracción con el código del participante
- Con una micropipeta, tomar 60 uL de sangre total heparinizada
- Depositar el contenido en el tubo con Buffer de extracción. La preparación se homogeneizará con suavidad con la misma micropipeta.
- Encender el bloque de calentamiento y programarlo para la primera temperatura de reacción (95°C).
- Desinfectar nuevamente el área de trabajo con alcohol.
- Incubar en el bloque de calentamiento a 95°C durante 5 minutos, los tubos que contiene la mezcla homogenizada de sangre y buffer de extracción. **NO INCUBAR MÁS DE 5 MINUTOS.**
- Remover los tubos inmediatamente y centrifugar a temperatura ambiente durante 3 minutos a 13.500 rpm.
- Rotular el tubo que contiene 345 uL de agua estéril con el código, iniciales del primer nombre y apellidos de la participante y fecha de ingreso.
- Transferir 30 µL del sobrenadante obtenido del tubo de extracción al tubo que contiene 345 uL con agua estéril, utilizar punta sin filtro para cada muestra. La hemoglobina precipitada hace un sedimento de color rojo-pardo en la parte inferior del tubo. Asegúrese de que ninguno de los precipitados se tome con la punta de la pipeta.
- Mezclar el sobrenadante con el agua estéril moviendo suavemente los tubos durante 10 segundos.
- El ADN diluido debe guardarse a 4°C si no va a ser procesado inmediatamente.

### 7.9. Amplificación de ADN con kit de LAMP

Nota: este procedimiento se realizará una vez se reciban las muestras procedentes de campo.

#### Materiales

- Guantes de nitrilo.
- Bata de laboratorio.
- Marcador indeleble.
- Lapicero.
- Tijeras.
- Cinta.
- Recipiente para descartar material biológico.
- Micropipetas volumen 20-200uL.
- Puntas con filtro volumen hasta 200uL.
- Gradilla tubos de microcentrífuga.
- Gradilla tubos LAMP.
- Formato de registro de resultados
- Bloque de calentamiento.
- Lámpara de luz UV
- Temporizador.
- Kits de reacción **LAMP PAN y Pf (SIEMPRE deben estar a temperatura ambiente, NUNCA deben ser guardados en nevera).**
- Bolsas Ziploc.
- Alcohol 70%.
- Hipoclorito de Sodio al 0.5%.
- Toallas de papel.
- Tubos Eppendorf con DNA extraído.

#### Consideraciones de relevancia

- Limpie el área de trabajo con 0,5% de hipoclorito de sodio.
- Mantener la zona de amplificación separada de la zona de preparación de muestras.
- No se recomienda proceder con más de 48 amplificaciones de ADN al mismo tiempo.
- Utilizar guantes de nitrilo nuevos.

#### Procedimiento

- Tener a la mano el formato de registro para documentar el código de la muestra, el tubo LAMP en el que fue procesada, tipo de reacción (PAN o Pf), lote, fecha.

**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS:** Dinámica de las infecciones submicroscópicas por *Plasmodium* spp. en una zona endémica para malaria en Colombia

- Encender el bloque de calentamiento a 65°C.
- Limpiar el área de trabajo con 0,5% de hipoclorito de sodio
- Ubicar en el área de trabajo todos los materiales necesarios para las reacciones de LAMP
- Sacar el número requerido de tubos de reacción Pan LAMP de la bolsa del kit. Se necesita un tubo para cada muestra, junto con un tubo para el control positivo y un tubo para el control negativo. No se pueden ejecutar más de 48 tubos simultáneamente.
- Sellar inmediatamente la bolsa con los tubos no utilizados para evitar contaminaciones.
- Sacar los tubos de los controles positivos y negativos del kit.
- Rotular cada tubo LAMP a usar.
- Para cada muestra, transferir 30uL de ADN a cada tubo de reacción al tubo correspondiente y cerrar la tapa inmediatamente antes de transferir la siguiente muestra de ADN para evitar contaminaciones.
- Transferir 30 uL del control negativo en el tubo de reacción LAMP rotulado como negativo y cerrar la tapa inmediatamente.
- Transferir 30uL de la solución de control positivo en el tubo de reacción LAMP rotulado como control positivo y cerrar la tapa inmediatamente.
- **SIEMPRE PREPARE EL CONTROL POSITIVO DE ÚLTIMO PARA EVITAR CONTAMINACIONES.**
- Cerrar los tubos con las soluciones de los controles Positivo y Negativo inmediatamente después de usarlos.
- Voltear los tubos boca abajo y agitar firmemente, para colectar el ADN en las tapas de los tubos.
- Incubar durante 2 minutos boca abajo a temperatura ambiente (los reactivos de LAMP están liofilizados en la tapa del tubo y este paso es necesario para disolverlos).
- Invertir y agitar firmemente los tubos de LAMP 10 veces para mezclar y disolver los reactivos (completando 5 arriba y abajo) como se indica en la siguiente imagen



- Agitar los tubos hacia abajo para recoger la solución en la parte inferior de los tubos.

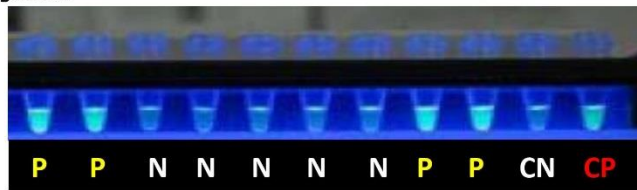
**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS:** Dinámica de las infecciones submicroscópicas por *Plasmodium* spp. en una zona endémica para malaria en Colombia

- Coloque inmediatamente los tubos de LAMP en el bloque de calentamiento precalentado e incube a 65°C durante 40 minutos.
- Ajuste la temperatura del bloque de calentamiento a 80°C.
- Incube los tubos a 80°C durante 5 minutos para detener la reacción.
- Detectar e interpretar los resultados.

Interpretación de resultados

Coloque los tubos bajo una lámpara UV y observe la fluorescencia de los tubos

- Si se emite luz verde: el ADN ha sido amplificado y la reacción es positiva
- Si no se emite ninguna luz: no se ha amplificado el ADN y la reacción es negativa.



*P: Muestra positiva, N: Negativo, CN: Control negativo, CP: Control positivo.*

Observe primero los controles positivo y negativo

- Si el control positivo emite fluorescencia es positivo y si el control negativo NO emite fluorescencia es negativo, el corrido de muestras es VÁLIDO y las reacciones pueden ser interpretados como positivos o negativos
- Si los controles no son los esperados, el corrido NO ES VÁLIDO y las reacciones de la muestra no debe ser interpretados. En caso de resultados no válidos, las reacciones de LAMP de todas las muestras en la corrida deben repetirse.
  - Informe los resultados de la corrida en el formato de reacción LAMP.
  - Por cada muestra POSITIVA en la reacción LAMP PAN, preparar y realizar una **REACCIÓN Pf LAMP** como la descrita en esta sección e incluir los controles positivos y negativos. Se recomienda ejecutar Pf LAMP en una sola corrida al final de la semana en todas las muestras LAMP Pan positivas detectadas.
  - Reporte los resultados de las muestras en los formatos correspondientes, con nombre y firma del responsable del procedimiento.
  - Tomar fotografía de la tanda montada, guardar el archivo y enviarlo a la microbióloga en Medellín (Jehidys Montiel Ramos) vía WhatsApp o correo electrónico



**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS:** Dinámica de las infecciones submicroscópicas por *Plasmodium* spp. en una zona endémica para malaria en Colombia

Los resultados serán interpretados de la siguiente forma:

- a) Si una muestra es negativa para la reacción Pan, significa que no está infectado con parásitos de *Plasmodium*
  - b) Si una muestra es positiva solamente para la reacción Pan, la muestra es positiva para infección por *Plasmodium* NO *P. falciparum*
  - c) Si la muestra es positiva para ambas reacciones Pan y Pf, la muestra es una infección por *P. falciparum*
- Descartar los tubos de reacción LAMP en bolsas Ziploc.
  - NUNCA ABRA LOS TUBOS DE REACCIÓN LAMP después de las reacciones.
  - NO AUTOCLAVE LOS TUBOS DE REACCIÓN DE LAMP USADOS
  - **IMPORTANTE:** todo lo anterior para evitar contaminaciones.

**7.10. Punción capilar día de seguimiento**

Para este día se tomará:

- Dos gotas gruesas.
- Papel de filtro Whatman #3.
- 60 uL en Buffer de extracción para LAMP.

Materiales

- Guantes
- Algodón
- Alcohol antiséptico
- 2 láminas portaobjetos nuevas, limpias.
- Papel de filtro # 3.
- 60 uL de Buffer de extracción.
- Micropipeta.
- Puntas 200 uL.
- Bolsa ziploc pequeña.
- Lancetas estériles
- Guardián de bioseguridad
- Marcador indeleble
- Cinta de enmascarar.
- Toallas de papel.
- Gradilla para tubos.
- Bolsas rojas y verdes pequeñas.
- Nevera de icopor con pila congelada.

Procedimiento:

- Preparar el material a utilizar y marcar adecuadamente las láminas portaobjeto, papel de filtro y bolsa y Buffer con las iniciales, el código de

**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS:** Dinámica de las infecciones submicroscópicas por *Plasmodium* spp. en una zona endémica para malaria en Colombia

cada participante y la fecha. Ubicar el papel de filtro sobre una toalla de papel recortada de aproximadamente las mismas dimensiones del papel de filtro.

- Colocarse los guantes y ubicar cómodamente al participante.
- Escoger el dedo para la punción (dedo índice o medio) y realizar asepsia de la zona con alcohol y algodón.
- Realizar presión en el dedo, con ayuda de una lanceta estéril realizar una punción rápida y firme en el borde de la yema del dedo.
- Realizar presión para favorecer la salida de sangre y limpiar la primera gota.
- Presionar el dedo para favorecer la salida de sangre hasta obtener una gota grande y globosa.
- Se coloca la lámina portaobjeto por encima de la gota de sangre evitando tocar la incisión hecha con la lanceta, sirviendo dos gotas de sangre por cada lámina.
- Empezar a elaborar las dos láminas de gota gruesa a partir de la segunda gota de sangre.
- Ayudado con otra lámina portaobjeto extender la muestra de sangre logrando un área aproximada de 1 cm x 1cm o de 1 cm x 1,5 cm. La muestra debe quedar homogénea (se recomienda hacer movimientos de vaivén)
- Dejar secar la muestra a temperatura ambiente por 20 minutos antes de ser coloreadas.
- Presionar el dedo para favorecer la salida de sangre para servirla en el papel de filtro procurando llenar los círculos por completo. Esperar al menos cinco minutos antes de guardar el papel de filtro en su bolsa.
- Tomar los 60 uL se con la ayuda de la micropipeta y depositarlo en el Buffer de extracción de LAMP.
- Depositar el vial en la gradilla y guardarlo en la nevera de icopor con la pila congelada para garantizar la conservación de la muestra.

**Flujograma 1  
CAPTACIÓN DE PARTICIPANTES ASINTOMÁTICOS Y SUBMICROSCÓPICOS**

Verificación de criterios de elegibilidad

- \* Mayor de 2 años
- \* No gestante
- \* No ingesta de antimaláricos 4 semanas previas
- \* No ingesta antibióticos 2 semanas previas

¿Cumple los criterios de elegibilidad?

Si

No

Desea participar

Si

No

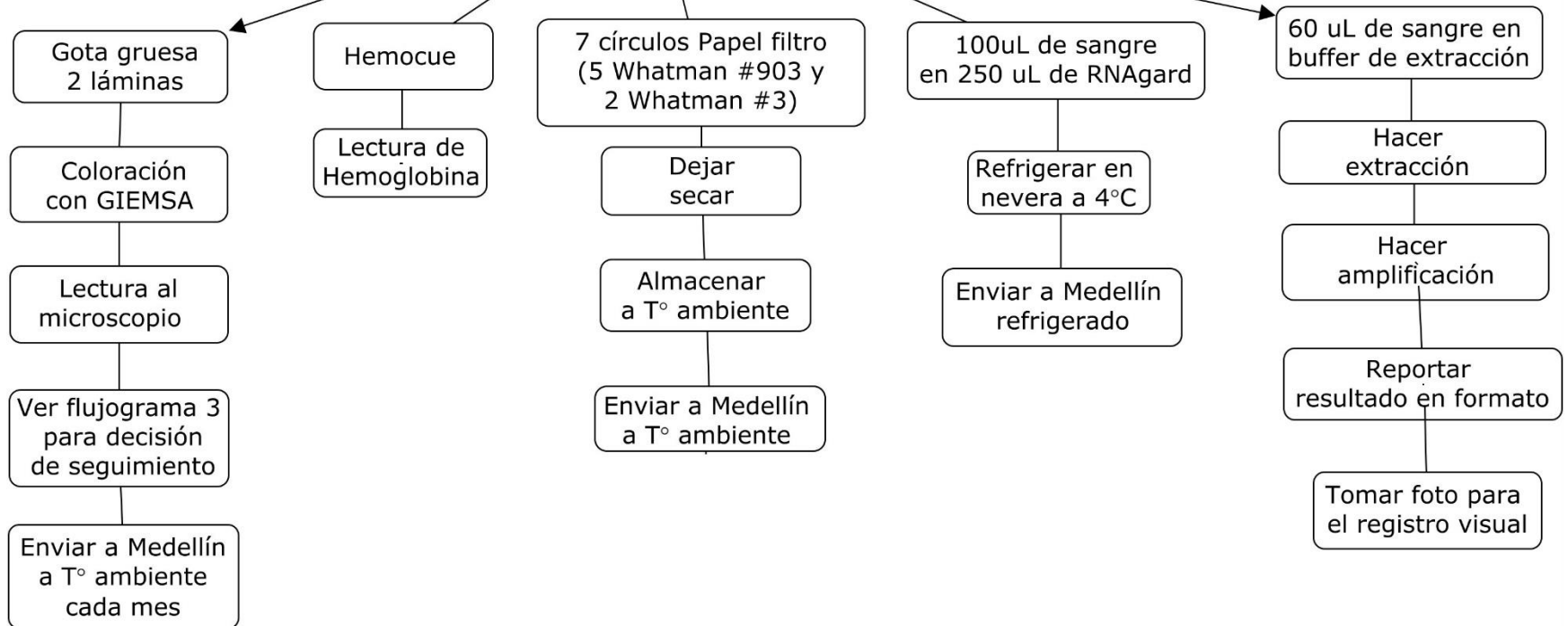
**Tratar como si  
no cumpliera criterios**

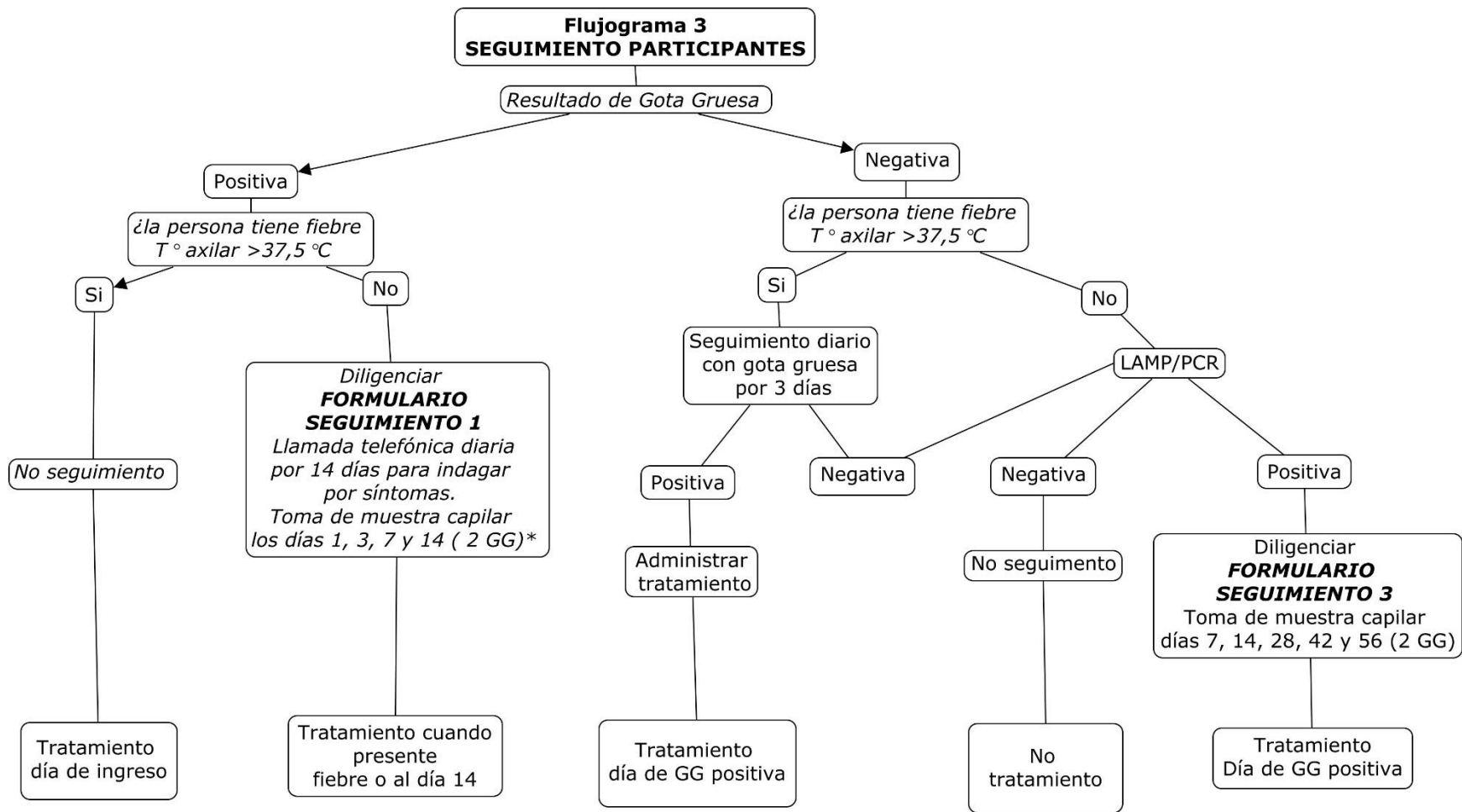
1. Llenar registro de ingreso en veredas.
2. Dar información sobre estudio e invitar a participar
3. Firmar consentimiento y asentimiento informado así:  
- Menores con menos de 7 años  
Consentimiento del padre o acudiente  
- Menores entre 7 y 17 años  
Asentimiento del menor y consentimiento del padre o acudiente  
- Mayor de 18 años  
Consentimiento del participante
4. Diligenciar cuestionarios de ingreso (individual y hogar)
5. Tomar temperatura.
6. Tomar muestra de sangre venosa (1 tubo de 4mL de Heparina).
7. Agradecer al participante
8. Entregar copia de consentimiento/asentimiento informado firmado.
8. Dar información de entrega de resultados e informar sobre posibles visitas de seguimiento

1. Llenar registro de ingreso en veredas.
2. Dar información sobre estudio e invitar a participar solo para toma de muestra capilar
3. Firmar consentimiento y asentimiento informado así:  
- Menores con menos de 7 años  
Consentimiento del padre o acudiente  
- Menores entre 7 y 17 años  
Asentimiento del menor y consentimiento del padre o acudiente  
- Mayor de 18 años  
Consentimiento del participante
4. Diligenciar cuestionarios de ingreso (individual y hogar).
5. Tomar temperatura.
- 6. Tomar muestra de sangre capilar (2 gotas gruesas y papel filtro Whatman #3).**
7. Agradecer al participante
8. entregar copia de consentimiento/ asentimiento informado firmado.
8. Dar información sobre resultado de gota gruesa en 24 horas

**Flujograma 2  
Procesamiento de muestra de sangre (1 tubo con Heparina)**

*A partir de sangre total (mezclar por inversión)*






\*Cualquier otro día que se requiera si la parasitemia aumenta.





 <b>UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA</b> <small>1949</small>	Dinámica de las infecciones sub-microscópicas por Plasmodium spp. en una zona endémica para malaria en Colombia	<b>CONFIDENCIAL</b> La información recolectada en esta encuesta es confidencial, anónima y
	<b>Registro de resultados LAMP</b>	

Fecha	<input type="text" value="d"/> <input type="text" value="d"/> <input type="text" value="m"/> <input type="text" value="m"/> <input type="text" value="a"/> <input type="text" value="a"/>	Responsable	<input type="text"/>	Lugar	<input type="text"/>
Nro. Lote Pan	<input type="text"/>	Nro. de muestras	<input type="text"/>		
Nro. Lote Pf	<input type="text"/>				

Pan   Pf	1	2	3	4	5	6	7	8
Codigo								
Resultado	Pos   Neg	Pos   Neg	Pos   Neg	Pos   Neg	Pos   Neg	Pos   Neg	Pos   Neg	Pos   Neg

Pan   Pf	1	2	3	4	5	6	7	8
Codigo								
Resultado	Pos   Neg	Pos   Neg	Pos   Neg	Pos   Neg	Pos   Neg	Pos   Neg	Pos   Neg	Pos   Neg

Pan   Pf	1	2	3	4	5	6	7	8
Codigo								
Resultado	Pos   Neg	Pos   Neg	Pos   Neg	Pos   Neg	Pos   Neg	Pos   Neg	Pos   Neg	Pos   Neg

Obsevaciones





UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

Dinámica de las infecciones sub-microscópicas por Plasmodium spp. en una zona endémica para malaria en Colombia

FORMULARIO DE SEGUIMIENTO 1

CONFIDENCIAL
La información recolectada en este cuestionario es confidencial, anónima y sólo se utilizará con fines de investigación

Fecha [d][d][m][m][a][a]

Iniciales [ ][ ][ ][ ]

Vivienda [ ][ ][ ][ ][ ][ ]

Código [ ][ ][ ][ ][ ][ ]

PARTICIPANTES CON GOTA GRUESA POSITIVA ASINTOMÁTICO

EVALUACIÓN DE SIGNOS Y SÍNTOMAS (marque 0=No 1=Si)

Table with 16 columns (DIA 1 to DIA 14, OTRO DIA, OTRO DIA) and 20 rows (Fecha, Temperatura axilar, Fiebre, Cefalea, Escalofríos, Sudoración, Dolor osteomuscular, Dolor abdominal, Náuseas, Palidez, Vómito, Diarrea, Brote en la piel, Prurito, Dolor faríngeo, Dificultad para respirar, Mareos, Tos, Sangrado, Adinamia, debilidad, Anorexia, Orina roja, naranja o café, Ictericia, Delirio, letargia, somnolencia, Otro (cual))

\*No diligenciar si es un participante que tiene GG positiva al ingresar al estudio (la información clínica de este día se registra en el cuestionario individual)



UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

Dinámica de las infecciones sub-microscópicas por Plasmodium spp. en una zona endémica para malaria en Colombia

FORMULARIO DE SEGUIMIENTO 3

CONFIDENCIAL

La información recolectada en este cuestionario es confidencial, anónima y sólo se utilizará con fines de investigación

Fecha [d][d][m][m][a][a]

Iniciales [ ][ ][ ]

Vivienda [ ][ ][ ][ ][ ]

Código [ ][ ][ ][ ][ ]

PARTICIPANTES CON GOTA GRUESA NEGATIVA Y PCR POSITIVA

EVALUACIÓN DE SIGNOS Y SÍNTOMAS ANTES DE INICIAR SEGUIMIENTO (DIA 0) (marque 0=No 1=Si)

	DIA 7	DIA 14	DIA 28	DIA 40	DÍA 60	OTRO DÍA	OTRO DÍA	OTRO DÍA	OTRO DÍA	OTRO DÍA
Fecha (dd/mm/aa)										
Temperatura axilar (°C)										
Fiebre										
Cefalea										
Escalofríos										
Sudoración										
Dolor osteomuscular										
Dolor abdominal										
Náuseas										
Palidez										
Vómito										
Diarrea										
Brote en la piel										
Prurito										
Dolor faríngeo										
Dificultad para respirar										
Mareos										
Tos										
Sangrado										
Adinamia, debilidad										
Anorexia										
Orina roja, naranja o café										
Ictericia										
Delirio, letargia, somnolencia										
Otro (cual)										

**INFORMACIÓN SOBRE CAMBIOS DURANTE EL SEGUIMIENTO**


	DÍA 7	DIA 14	DIA 28	DIA 40	DÍA 60	OTRO DÍA	OTRO DÍA	OTRO DÍA	OTRO DÍA	OTRO DÍA
Se ha desplazado a otra vereda/municipio desde la última visita (Si/No)?										
Nombre del lugar al cual se desplazó										
El lugar donde se desplazó es zona endémica para malaria (Si/No)?										
Cuanto tiempo estuvo por fuera de su residencia (en días)?										
Ha consumido antimaláricos desde la última visita hasta hoy (Si/No)?										
Ha consumido antibióticos desde la última visita hasta hoy (Si/No)?										

**RESULTADOS DE LABORATORIO**

	DÍA 7	DIA 14	DIA 28	DIA 40	DÍA 60	OTRO DÍA	OTRO DÍA	OTRO DÍA	OTRO DÍA	OTRO DÍA
Fecha (dd/mm/aa)										
Resultado Gota Gruesa										
Parasitemia total (p/uL)										
Parasitemia asexuados (p/uL)										
Parasitemia sexuados (p/uL)										
Resultado PCR										
Se remite a tratamiento (Si/No)										
Tipo de tratamiento recibido										

FIRMA DE QUIEN DILIGENCIA EL CUESTIONARIO	
FECHA Y FIRMA DE REVISIÓN	

## Anexo C3.6. Acta de aprobación del comité de Ética

 UNIVERSIDAD DE ANTIIOQUÍA 1949	<b>ACTA APROBACION PROYECTOS</b>	<b>FACULTAD DE MEDICINA</b>
		<b>CÓDIGO</b> F-017-00
		<b>VERSIÓN</b> 01

Acta de aprobación No. 014

Nombre del proyecto: "Dinámica de las infecciones submicroscópicas por Plasmodium spp. En una zona endémica para malaria en Colombia".

Investigador Principal: Alberto Tobón Castaño

Versión No 1


Enmienda revisada: NO

Fecha de aprobación: **09 de agosto del 2017**

El Comité de Ética del Instituto de Investigaciones Médicas se constituyó mediante Resolución del Consejo de Facultad en reunión del 30 de mayo 2008, acta 177 y está regido por los principios éticos vigentes en la Resolución 003480 del 4 de octubre de 1993, la Declaración de Helsinki de 2008, la Asamblea Médica Mundial y el Departamento de Salud y Servicios Humanos del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica Resolución 2378 del 2008. En ellos se delinean las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en seres humanos.

El Instituto de Investigaciones Médicas certifica que:

1. Se revisaron los siguientes documentos en el presente proyecto:
  - a. Resumen del proyecto ( NO )
  - b. Protocolo de investigación ( SI )
  - c. Formato de recolección de datos ( SI )
  - d. Formato de consentimiento informado (SI)
  - e. Manual del investigador ( NO )
  - f. Evaluaciones de otros comités de ética ( NO )
2. El proyecto fue aprobado por los siguientes miembros: Dr. Gabriel Jaime Montoya Montoya, Dr. José Antonio García Pereañez, Dra. Sonia del Pilar Agudelo López, Dra. Paula Andrea Velilla Hernández, Dra. Olga Lucía Giraldo Salazar, Dr. Julio Cesar Bueno y Dr. Daniel Felipe Patiño Lugo.
3. El comité considera que el proyecto no contiene tensiones éticas que vulneren los derechos y el bienestar de los participantes. El riesgo involucrado en el estudio es:
  - a) Sin riesgo ( )
  - b) Riesgo mínimo (X)
  - c) Riesgo mayor que el mínimo ( )
4. El comité considera que tanto la forma de obtención del consentimiento cuando aplica como las medidas tomadas para proteger el bienestar y los derechos de los participantes son adecuadas. No aplica
5. El comité se reserva el derecho de hacer nuevas revisiones del proyecto a solicitud de alguno o algunos de sus miembros o de las directivas institucionales con el fin de revisar lo relacionado con el bienestar y los derechos de los participantes en la investigación.

 UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA 1955	<b>ACTA APROBACION PROYECTOS</b>	<b>FACULTAD DE  MEDICINA</b>
		<b>CÓDIGO</b> F-017-00
		<b>VERSIÓN</b> 01

6. El comité deberá informar a las directivas institucionales correspondientes cualquier evento tocante con faltas de cumplimiento de las obligaciones del investigador en el desarrollo del proyecto, de las solicitudes del comité o suspensiones del proyecto por razones de tipo ético.
7. Se informara a la dirección del Instituto de Investigaciones sobre situaciones como: 1) efectos dañinos que se ocasionen a los participantes de esta investigación; 2) situaciones que signifiquen riesgos para los participantes o para personas independientes; 3) cambios ocurridos en el proyecto que fueran aprobados por el comité; y 4) situaciones distintas que de alguna manera puedan influenciar negativamente el buen desarrollo de la investigación.
8. La aprobación de este proyecto tendrá una duración de un año a partir de la fecha de aprobación; si se debe continuar por más tiempo, deberá someterse a aprobaciones anuales hasta la finalización del mismo. El investigador deberá anexar la documentación pertinente para cada nueva revisión del proyecto por parte del comité.

El investigador deberá informar al comité y al Instituto sobre los siguientes eventos:

- a. Cambios que se realicen en el proyecto, los cuales deberán ser aprobados en una nueva sesión del comité.
- b. Situaciones imprevistas que puedan implicar riesgos para los participantes.
- c. Efectos adversos que ocurran en los participantes, en las 24 horas siguientes a su ocurrencia.
- d. Alteraciones del rumbo de la investigación que alteren la adecuada proporción entre riesgos y beneficios.
- e. Las decisiones tomadas por comités de ética de otras instituciones que participen en el proyecto.
- f. Los informes parciales, finales o de suspensión temporal o permanente del proyecto, con las debidas razones que los justifiquen.

El investigador deberá presentar informes parciales del estudio cada ( 6 ) meses.

En este proyecto no se encontraron conflictos de interés por parte de los investigadores.

**Sugerencias y comentarios:** Favor enviar informe de avance Febrero de 2018

Nota: Para efectos de la investigación sólo podrá utilizarse el Consentimiento Informado avalado, con el sello del Comité de Bioética.

  
GABRIEL JAIME MONTOYA MONTOYA  
Presidente  
Comité de Bioética