



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **La vigilancia de la malaria asintomática y su contribución al programa de eliminación de la malaria en Guapi-Cauca, Colombia**

**Rubiela Angélica Knudson Ospina**

Universidad Nacional de Colombia  
Doctorado Interfacultades en Salud Pública  
Bogotá D.C., Colombia

2019



# **La vigilancia de la malaria asintomática y su contribución al programa de eliminación de la malaria en Guapi-Cauca, Colombia**

**Rubiela Angélica Knudson Ospina**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Doctor en Salud Pública**

Director:

Ph.D. Ciencias Biomédicas. Vladimir Corredor Espinel

Codirector:

Doctor en Salud Pública. Norman Giovanni Apráez Ippolito

Grupo de Investigación:

Salud, Ambiente y Trabajo. Doctorado Interfacultades en Salud Pública

Infecciones y salud en el trópico. Facultad de Medicina

Universidad Nacional de Colombia

Doctorado Interfacultades en Salud Pública

Bogotá D.C., Colombia

2019



*Este documento de tesis está dedicado especialmente a la Comunidad Guapireña y a todas las comunidades afro-colombianas que viven el flagelo de la malaria y muchas enfermedades infecciosas producto del abandono y del aislamiento y que requieren una pronta atención del Estado colombiano.*



## **Agradecimientos**

Vladimir Corredor Espinel, Norman Giovanni Apraez Ippolito y Ricardo Sánchez Pedraza, Director, Codirector y Epidemiólogo del presente documento de Tesis, Profesores de la Universidad Nacional de Colombia.

Julian Rayner y Alena Pance, tutores en el Programa de Malaria del Wellcome Sanger Institute, en Cambridge, Reino Unido.

Kevin Tetteh y Tate Oulton, tutores en el Departamento de Inmunología e Infecciones del London School of Hygiene and Tropical Medicine en Londres, Reino Unido.

Myriam Janeth Salazar Terreros, Post-Doctorado en el Centro de Hematología y Hemoterapia de la Universidad Estatal de Campinas, Brasil y Samanta Lizbeth Aponte Briceño, MsC en Ciencias Básicas Biomédicas, Profesional especializado contratista del Laboratorio de Parasitología de la Universidad Nacional de Colombia, por sus aportes en el análisis de datos y en la revisión y edición del documento final.

Olga Lucía Ospina Rodríguez (Bacterióloga y Epidemióloga, contratista del proyecto “Herramientas, formación y redes encaminadas a reducir la carga por la malaria en Colombia”); Yoseth Jesualdo Ariza Araujo (Profesor del Departamento de Salud Pública y Medicina Comunitaria, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad ICESI, Colombia), Carlos Alberto Vásquez-Londoño (Candidato Doctorado en Ciencias Farmacéuticas, Universidad Nacional de Colombia), Rodolfo Arce Lozano y Edgar Sebastián Bolívar Barbosa (Licenciados en Biología, Universidad Distrital, Colombia), por sus aportes en el análisis estadístico de los datos.

Lyda Elena Osorio Amaya (Profesora de la Escuela de Salud Pública de la Universidad del Valle, Colombia), Martha Lucía Alzate (Profesora del Doctorado Interfacultades en Salud Pública, Universidad Nacional de Colombia), Rubén Santiago Nicholls Orejuela (Asesor Regional, Enfermedades Infecciosas Desatendidas, Organización Panamericana de la Salud), Diego Fernando Echeverri García (Profesor del Departamento de Ciencias

Biológicas, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad ICESI, Colombia), María Fernanda Cañón Rodríguez (Candidata Doctorado Interfacultades en Salud Pública, Universidad Nacional de Colombia), Daniel Marín (Psicólogo, MsC Desarrollo educativo y social), Yenny Marcela Barreto Zorza (Profesora Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario, Colombia), Yenny Yolanda Lozano Jiménez (Profesora del Departamento de Ciencias Básicas, Universidad de La Salle, Colombia) y Myriam Consuelo López Páez (Profesora del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia) por su orientación y sugerencias en el análisis de la información.

Myriam Lucía Navarrete Jiménez y Carlos Alberto Parra López (Profesores del Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia), Ángela Patricia Guerra Vega (Profesional Especializado del Instituto Nacional de Salud, Colombia), Natalia Gómez López (Estudiante de la Maestría en Geografía de la Universidad de Los Andes, Colombia) y Alejandro Marín Menéndez (Post-Doctorado en el Grupo Malaria del Wellcome Sanger Institute, en Cambridge, Reino Unido) por su revisión del documento final.

Tatiana Roa Lozada, Sergio Fabián Rodríguez Castañeda, Mary Isabel Vargas Rincón, Carlos Albeiro Castañeda Daza, Christian Camilo Toquica Gaona, Julián Felipe Porras Villamil, Cristhian Rincón Carreño, Alvaro Luis Ordoñez Villa, Juan Camilo Ruano Moncayo, Elkin Leonardo Simanca Castro, estudiantes de medicina, por sus aportes en el trabajo de campo y alimentación de las bases de datos.

Manuela Carrasquilla y Sonia Goncalves del Programa Malaria del Wellcome Sanger Institute, en Cambridge, Reino Unido, por el procesamiento de muestras.

Carlos Felipe Castillo, funcionario de la Secretaria Departamental de Salud del Cauca y a Luz Adriana Olaya Másmela, Luis Gover Diuza Sánchez, Liliana Yasiry Mosquera, Elvira Mancilla, Sandra Perlaza Rodríguez, Albida Luz Orobio Tenorio, Yenni Rocío Orobio Vidal, Mireya Rodríguez Montaña, Yolanda Sinisterra Cuero, Sebastiana Montaña Castro, Gregoria Montaña, Ana Milena Aguirre Caicedo, contratistas del proyecto “Herramientas, formación y redes encaminadas a reducir la carga por la malaria en Colombia”, por su participación en el desarrollo del trabajo de campo.

A la comunidad guapireña en general por su amable y cálida acogida.



Eliana Bolaños Bolaños, Anderson Hair Piamba Dorado, René Zúñiga López, Bertha Guzmán, Cesar Arizabaleta, Nelson Cuero, Ricardo Montaña, Arlen Obregón, Alberto Ponce, funcionarios de la Secretaría Departamental de Salud del Cauca por sus aportes en el desarrollo del trabajo de campo y suministro de información epidemiológica.

Julián Alejandro Contreras Martínez y Catherine Aguilar Buitrago, funcionarios del Laboratorio de Parasitología de la Universidad Nacional de Colombia por su aporte en la organización del material para trabajo de campo y procesamiento de muestras en dicho laboratorio.

Programa de Doctorado Interfacultades en Salud Pública, especialmente a Sandra Patricia Rozo Gómez, por su gestión administrativa.

## **Financiación**

El desarrollo del presente trabajo se logró gracias a la financiación del proyecto titulado “Herramientas, formación y redes encaminadas a reducir la carga por la malaria en Colombia”, por parte del Fondo Newton-Caldas del Consejo Británico, con la participación del Wellcome Sanger Institute, Cambridge, Reino Unido, la Secretaría de Salud Departamental del Cauca y la Universidad Nacional de Colombia. Estos fondos permitieron la financiación de las actividades de diagnóstico y tratamiento de la malaria en los puestos de Guapi, El Cuerval y El Carmelo en el departamento de Cauca y Chanzará en el departamento de Nariño; de igual forma, con estos fondos se llevaron a cabo las actividades comunitarias encaminadas al control de la malaria en el barrio Santa Mónica de Guapi, con la participación de la Secretaría de Salud Municipal.

Se contó con el apoyo de la Beca Colciencias-Colfuturo, Convocatoria 617 de 2013 de Colciencias. Estas becas fueron asignadas a los programas doctorales de la Universidad Nacional de Colombia.

## Resumen

El control de malaria debe incidir en diferentes factores de la dinámica de transmisión (humano, vector, parásito). Diseñar la estrategia ideal para eliminarla requiere del conocimiento del comportamiento de la malaria sintomática y asintomática, identificación de portadores de gametocitos, conocimiento de tasas de exposición previa y caracterización de estructuras poblacionales de los parásitos.

**Objetivo:** Determinar si la búsqueda activa de casos de malaria asintomática es una estrategia adecuada en procesos eventuales de eliminación de malaria en Guapi-Cauca, Colombia.

**Metodología.** Se estimó la prevalencia de malaria asintomática y portadores de gametocitos en Santa Mónica (Guapi-Cauca) y El Cuerval (Timbiquí-Cauca) en individuos seleccionados aleatoriamente (corte transversal, 2015-2017) y diagnosticados por microscopía y PCR; se determinaron características genotípicas y estructura poblacional de parásitos causantes de malaria sintomática usando SNPs (Guapi-Cauca, 2014-2017) y se identificaron grupos de riesgo para infección por malaria en las dos localidades, evaluando reactividad de anticuerpos en micromatrices (microarrays) de antígenos parasitarios y usando análisis multivariable.

**Resultados y conclusiones:** La prevalencia de infección asintomática microscópica por *P. falciparum* fue del 1% (13/1368) y del 0,6% (8/1368) para la submicroscópica. Por primera vez en Colombia se reportó el genotipo CVIDT en el gen *pfcr1*, asociado a resistencia de *P. falciparum* a cloroquina. Se encontraron genotipos de los genes PBG (VDDNI con mutación en *pfmdr2*), que podrían asociarse a respuesta terapéutica limitada de *P. falciparum* a derivados de artemisinina. Se identificó una población estructurada de *P. falciparum* con 3 subpoblaciones (coeficientes de diferenciación genética: 0,84, 0,77, 0,39). Se demostró la exposición previa de la población a la infección malárica con niveles de serorreactividad a *P. falciparum* de 56%, 562/1003 y *P. vivax* de 6,2%, 62/1003.

La eliminación de malaria en Guapi requiere vigilancia permanente de infecciones (sintomáticas y asintomáticas), de marcadores moleculares de resistencia y seguimiento postratamiento, además de procesos dinámicos y voluntad política.

**Palabras clave:** Malaria, Programas nacionales de salud, Estudios Seroepidemiológicos, Técnicas de Diagnóstico Molecular, Vigilancia epidemiológica.

## Abstract

Control of malaria relies on numerous factors across humans, mosquitoes and parasites. Identifying the best strategies for malaria elimination within a given population requires deep understanding of the prevalence of malaria (both symptomatic and asymptomatic), the frequency with which individuals carry infectious gametocytes, the rate of previous exposure to malaria, and characterization of the population structure of *Plasmodium* parasites.

**Aim:** To explore how active searching for asymptomatic malaria cases in Guapi can inform an eventual malaria elimination process in Cauca, Colombia.

**Methodology:** Cross-sectional study and active asymptomatic malaria case detection (2015-2017) in Guapi-Cauca and El Cuerval, Timbiquí-Cauca, using simple random sampling, parasitological diagnosis by conventional light microscopy and molecular diagnosis by PCR. Passive search of symptomatic malaria cases was also carried out (2014-2017). Symptomatic infectious were genotyped using variable SNPs and molecular resistance markers, and the data was used to determine the *Plasmodium falciparum* population structure. *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* protein microarrays were generated and used to profile antibody responses in asymptomatic individuals (2015-2017) in order to identify previous exposures and risk groups for malarial infection.

**Results and conclusions:** The microscopic asymptomatic *P. falciparum* prevalence was of 1% (13/1368) and the submicroscopic asymptomatic *P. falciparum* prevalence was of 0.6% (8/1368). The CVIDT genotype in the *pfcr1* gene was reported for the first time in Colombia, which is associated with *P. falciparum* chloroquine resistance. A novel VDDNI of the PBG group genes was associated with a mutation in the *pfmdr2* gene, which could be associated with limited therapeutic response of *P. falciparum* to artemisinin derivatives. Investigation of the *P. falciparum* population structure identified 3 subpopulations, whose coefficients of genetic differentiation ( $F_{st}$ ) were 0.84, 0.77 and

0.39. Different levels of seroreactivity to *P. falciparum* infection (56%, 562/1003) and *P. vivax* infection (6.2%, 62/1003) were detected, which demonstrates extensive previous exposure of the population to malarial infection. Malaria elimination process in Guapi requires permanent surveillance of symptomatic and asymptomatic infection, molecular markers of resistance and monitoring the efficacy of antimalarial medicines. This one must be dynamic and strong political commitment is required.

**Keywords:** Malaria, National Health Programs, Seroepidemiologic Studies, Molecular Diagnostic Techniques, Epidemiological Monitoring

# Contenido

<b>Resumen</b> .....	<b>XI</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>XIII</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>XVIII</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>XX</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Marco teórico</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1 Situación epidemiológica de la malaria. Mundial, Regional, Local</b> .....	<b>7</b>
1.1.1 El municipio de Guapi y la situación de la malaria.....	9
1.1.2 La malaria asintomática. Definición y contexto epidemiológico.....	11
1.1.3 La herramienta serológica en la vigilancia en malaria .....	15
1.1.4 Diagnóstico de las infecciones por <i>Plasmodium</i> .....	19
<b>1.2 El parásito</b> .....	<b>23</b>
1.2.1 Ciclo biológico de la infección natural por <i>Plasmodium</i> .....	23
1.2.2 Estructura genética de la población de <i>Plasmodium</i> y marcadores genéticos de la resistencia a los antimaláricos .....	30
1.2.3 Análisis del polimorfismo de nucleótido único (SNPs) y microsatélites en la descripción de la estructura genética de <i>P. falciparum</i> .....	33
<b>1.3 Dinámica de transmisión de la malaria</b> .....	<b>36</b>
1.3.1 Intensidad de la transmisión y otras definiciones en malaria.....	36
<b>1.4 Historia del control y la eliminación de la malaria</b> .....	<b>40</b>
<b>Referencias</b> .....	<b>45</b>
<b>2. Objetivo específico 1</b> .....	<b>57</b>
<b>2.1 Objetivo específico 1</b> .....	<b>57</b>
<b>2.2 Metodología</b> .....	<b>57</b>
2.2.1 Tipo de estudio.....	57
2.2.2 Sitio de estudio.....	57
2.2.3 Comportamiento de la malaria en Guapi durante el periodo de estudio .....	59
2.2.4 Definición de caso de malaria asintomática.....	59
2.2.5 Estudio de campo. Marco muestral. Censo .....	59
2.2.6 Tamaño de muestra y selección de los individuos .....	59
2.2.7 Recolección de la información, muestras de sangre y seguimiento de los individuos	61
2.2.8 Examen microscópico. Gota gruesa .....	62

---

2.2.9	Detección de parásitos del género <i>Plasmodium</i> por PCR.....	62
2.2.10	Análisis estadístico.....	64
<b>2.3</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>64</b>
2.3.1	Comportamiento de la malaria en Guapi durante el periodo de estudio .....	64
2.3.2	Malaria asintomática .....	68
2.3.3	Características demográficas de la población estudiada.....	68
2.3.4	Antecedentes de malaria en la población estudiada .....	70
2.3.5	Características clínicas de la población estudiada .....	71
2.3.6	Descripción de infección subclínica y asintomática microscópica y submicroscópica .....	71
<b>2.4</b>	<b>Discusión .....</b>	<b>80</b>
	<b>Referencias.....</b>	<b>86</b>
<b>3.</b>	<b>Objetivo específico 2 .....</b>	<b>91</b>
3.1	Objetivo específico 2.....	91
3.2	Metodología.....	91
3.2.1	Tipo de estudio.....	91
3.2.2	Recolección y procesamiento de las muestras.....	92
3.2.3	Extracción de ADN del parásito .....	92
3.2.4	Genotipificación de SNPs .....	93
3.2.5	Caracterización de los genotipos relacionados con SNPs asociados a genes de resistencia a los antimaláricos .....	94
3.2.6	Análisis del conjunto de SNPs (código de barras) y determinación de la estructura de la población de <i>P. falciparum</i> .....	95
<b>3.3</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>97</b>
3.3.1	Características demográficas y parasitológicas de los individuos con infección sintomática por malaria .....	97
3.3.2	Genotipificación de los parásitos causantes de infección sintomática a partir de SNPs asociados a genes de resistencia a los antimaláricos .....	98
3.3.3	Identificación y caracterización de las infecciones múltiples en los individuos sintomáticos para malaria .....	107
3.3.4	Estructura de la población de <i>P. falciparum</i> .....	108
<b>3.4</b>	<b>Discusión .....</b>	<b>112</b>
3.4.1	Perfil genético en genes asociados a resistencia a los antimaláricos evaluados .....	112
3.4.2	Mutaciones en el gen <i>pfcr1</i> asociadas a la resistencia a cloroquina .....	113
3.4.3	Mutaciones en el gen <i>pfdhfr</i> asociadas a la resistencia a pirimetamina.....	117
3.4.4	Mutaciones en el gen <i>pfdhps</i> asociadas a la resistencia a sulfadoxina .....	121
3.4.5	Mutaciones en el gen <i>pfexo</i> asociadas a la resistencia a piperquina.....	126
3.4.6	Mutaciones en el gen <i>pfmdr1</i> asociadas a la resistencia/susceptibilidad a cloroquina, amodiaquina, lumefantrina y mefloquina .....	127
3.4.7	Mutaciones en el grupo de genes PGB asociadas a la resistencia a la artemisinina .....	129
3.4.8	Diversidad genética y estructura de población de <i>P. falciparum</i> .....	132
	<b>Referencias.....</b>	<b>136</b>
<b>4.</b>	<b>Objetivo específico 3 .....</b>	<b>145</b>
4.1	Objetivo específico 3.....	145



<b>4.2 Metodología</b> .....	<b>145</b>
4.2.1 Tipo de estudio.....	145
4.2.2 Selección de antígenos.....	146
4.2.3 Producción de los 18 antígenos en el Wellcome Sanger Institute. Sistema de expresión celular en eucariotas.....	146
4.2.4 Antígenos producidos en el London School of Hygiene and Tropical Medicine. Sistema de expresión celular en procariontes.....	148
4.2.5 Micromatriz (microarray) de proteínas y predicción de la exposición a la malaria ....	150
4.2.6 Análisis de imágenes de las micromatrices y normalización de datos.....	151
4.2.7 Análisis estadístico.....	151
<b>4.3 Resultados</b> .....	<b>152</b>
4.3.1 Características demográficas y parasitológicas de los individuos seleccionados.....	152
4.3.2 Descripción de la reactividad a los antígenos de <i>P. falciparum</i> y <i>P. vivax</i> .....	155
4.3.3 Definición de la variable dependiente “respuesta serológica”.....	158
4.3.4 Modelo de predicción de seropositividad a la infección malárica.....	159
<b>4.4 Discusión</b> .....	<b>164</b>
<b>Referencias</b> .....	<b>172</b>
<b>5. Discusión final</b> .....	<b>177</b>
<b>5.1 Propuesta para el abordaje del problema: Unidad de Control de la Región Guapi</b> .....	<b>196</b>
<b>Referencias</b> .....	<b>200</b>
<b>6. Conclusiones y recomendaciones</b> .....	<b>205</b>
<b>6.1 Conclusiones</b> .....	<b>205</b>
<b>6.2 Recomendaciones</b> .....	<b>206</b>
<b>A. Anexo: Consentimientos Informados, Aprobación del Comité de Ética y Formato para recolección de datos</b> .....	<b>209</b>
<b>B. Anexo: Protocolo del Kit-QIAGEN, QIAamp® DNA Micro Kit para extracción de ADN - Esquema general de la estructura de los genes asociados a la resistencia a los antimaláricos</b> .....	<b>231</b>
<b>C. Anexo: MIDI-prep. Plasmid DNA purification (NucleoBond® Xtra Midi / Maxi)</b> ...237	
<b>D. Anexo: Purificación de antígenos de <i>P. falciparum</i> y <i>P. vivax</i> con imidazol</b> .....239	
<b>E. Anexo: Electroforesis de proteínas</b> .....241	
<b>F. Anexo: Determinación de proteínas por la técnica de Bradford. Quick Start™ Bradford Protein Assay Gel de proteínas- BIORAD</b> .....243	
<b>G. Anexo: Micromatriz (microarray) de proteínas</b> .....245	
<b>H. Anexo: Productos asociados a la tesis doctoral</b> .....249	

## Lista de figuras

	<i>Pág.</i>
<b>Figura 1-1:</b> Estructura de los Apicomplexa. Fuente: Fréchal K, et al., 2017. ....	24
<b>Figura 1-2:</b> Ciclo biológico de la infección por <i>Plasmodium</i> en humanos. Fuente: White NJ, et al., 2014.....	29
<b>Figura 1-3:</b> El número $R_0$ y la relación dinámica de los parámetros humanos y del vector. Fuente: Smith DL, et al., 2007.....	39
<b>Figura 2-1:</b> Mapa de sitios de procedencia de los individuos incluidos en el estudio. Santa Mónica, Guapi y El Cuerval, Timbiquí. ....	58
<b>Figura 2-2:</b> Comportamiento de la malaria en Colombia, Guapi y El Cuerval. 2014 – 2017.....	66
<b>Figura 2-3:</b> Canales endémicos para la infección por <i>P. falciparum</i> por semanas epidemiológicas, Guapi y Timbiquí, Cauca. Vigencia 2017 .....	67
<b>Figura 2-4:</b> Detección de asintomáticos para <i>P. falciparum</i> y <i>P. vivax</i> . Libretas 4, 5 y 6. El Cuerval, diciembre 2015. ....	74
<b>Figura 2-5:</b> Detección de asintomáticos para <i>P. malariae</i> libretas 11, 12, 13, 14,15. Santa Mónica, octubre 2015.....	74
<b>Figura 2-6.</b> Ubicación geográfica de los casos de malaria asintomática en El Cuerval, Timbiquí, Cauca. 2015 y 2017. ....	79
<b>Figura 2-7.</b> Ubicación geográfica de los casos de malaria asintomática en el barrio Santa Mónica, Guapi, Cauca. 2015 y 2016. ....	79
<b>Figura 3-1:</b> Mapa con la ubicación geográfica de los puestos de diagnóstico de la Red de Diagnóstico de Malaria del departamento del Cauca: Guapi, El Cuerval, Chanzará y El Carmelo. ....	98
<b>Figura 3-2:</b> Distribución por procedencia de los haplotipos completos y con mayor frecuencia para cada gen. Región Guapi-Cauca. 2014-2017.....	102
<b>Figura 3-3.</b> Frecuencias de alelos silvestres y mutantes por cada posición evaluada en cada uno de los genes analizados. Región Guapi-Cauca. 2014-2017. ....	104

---

<b>Figura 3-4:</b> Frecuencias de los alelos silvestres y mutaciones específicas en cada posición de cada gen evaluado. Región Guapi-Cauca. 2014-2017. A: <i>pfprt</i> , <i>pfdhfr</i> y <i>pfdhps</i> . .....	105
<b>Figura 3-4: (Continuación)</b> Frecuencias de los alelos silvestres y mutaciones específicas en cada posición de cada gen evaluado. Región Guapi-Cauca. 2014-2017. B: <i>pfexo</i> , <i>pfmdr1</i> y <i>PBG</i> . .....	106
<b>Figura 3-5:</b> Distribución por procedencia de las infecciones múltiples. Región Guapi-Cauca. 2014-2017. ....	108
<b>Figura 3-6:</b> Determinación de la estructura poblacional de <i>P. falciparum</i> . Región Guapi-Cauca. 2014-2017. ....	109
<b>Figura 3-7:</b> Dendrograma de parásitos de <i>P. falciparum</i> . Cauca, 2014-2017. ....	111
<b>Figura 4-1:</b> Estructura de la micromatriz (microarray) de proteínas. ....	151
<b>Figura 4-2:</b> Antígenos de <i>P. falciparum</i> reactivos en la población evaluada. Santa Mónica y El Cuerval, Cauca. 2015- 2017. ....	156
<b>Figura 4-3:</b> Antígenos de <i>P. falciparum</i> y <i>P. vivax</i> con mayor reactividad en la población evaluada. Santa Mónica y El Cuerval, Cauca. 2015- 2017. A: Antígenos de <i>P. falciparum</i> . B: Antígenos de <i>P. vivax</i> . ....	157
<b>Figura 5-1:</b> Tendencia del comportamiento epidemiológico de la malaria y su relación con eventos sociales, económicos, climáticos y administrativos del programa para el control de la malaria. Cauca 2007-2015. ....	182
<b>Figura 5-2:</b> Distribución de las intervenciones al medio ambiente por la minería u otras actividades humanas y la ubicación geográfica de las localidades con mayor número de casos de malaria reportados. Región Guapi-Cauca. 2014-2017. ....	188
<b>Figura 5-3:</b> Mapa con la ubicación geográfica de las localidades con mayor número de casos de malaria reportados. Región Guapi-Cauca. 2014-2017. ....	198

## Lista de tablas

**Pág.**

<b>Tabla 1-1:</b> Comportamiento de la malaria en el municipio de Guapi, Cauca, 2007 – 2014, por especie parasitaria.....	11
<b>Tabla 1-2:</b> Antígenos de Plasmodium utilizados con frecuencia en los estudios de seroprevalencia (Elliott SR, et al., 2014). .....	18
<b>Tabla 1-3:</b> Diferencias entre zonas de alta y baja transmisión en cuanto a la intensidad de transmisión, la estructura de la población de <i>P. falciparum</i> , la respuesta inmune y la malaria.....	35
<b>Tabla 1-4:</b> Objetivos, hitos y metas de la Estrategia Técnica Mundial contra la Malaria, 2016-2030.....	43
<b>Tabla 2-1:</b> Secuencias de los iniciadores utilizados para la detección de especies de <i>Plasmodium</i> por PCR.....	63
<b>Tabla 2-2:</b> Distribución de casos de infección por <i>P. falciparum</i> e IFA en Colombia, el Pacífico Caucano, Guapi y El Cuerval. 2014 – 2017 (INS, 2014–2017). .....	65
<b>Tabla 2-3:</b> Características demográficas de la población estudiada por muestreo. Santa Mónica y El Cuerval, Cauca. 2015- 2017. ....	69
<b>Tabla 2-4:</b> Frecuencias de episodios anteriores de malaria y uso de toldillo en la población estudiada por muestreo. Santa Mónica y El Cuerval, Cauca. 2015- 2017.....	71
<b>Tabla 2-5:</b> Prevalencias de infección subclínica y asintomática por malaria diagnosticadas por microscopía y PCR e índice de correlación de estas pruebas. Santa Mónica y El Cuerval, Cauca. 2015- 2017. ....	73
<b>Tabla 2-6:</b> Características parasitológicas, de diagnóstico molecular, demográficas y antecedentes de los individuos con infección subclínica y asintomática por malaria diagnosticados por microscopía y PCR en el día 0. Santa Mónica y El Cuerval, Cauca. 2015- 2017.....	76

<b>Tabla 2-7:</b> Características parasitológicas, de diagnóstico molecular, demográficas y antecedentes de los individuos con infección subclínica y asintomática por malaria diagnosticados por PCR (infección sub-microscópica). Santa Mónica y El Cuerval, Cauca. 2015- 2017.....	77
<b>Tabla 3-1:</b> Genes asociados a la resistencia a los antimaláricos, codones evaluados en cada gen y haplotipos silvestres correspondientes.....	94
<b>Tabla 3-2:</b> SNPs usados para el análisis de la estructura poblacional de <i>P. falciparum</i> .	95
<b>Tabla 3-3:</b> Distribución de los casos de malaria y de las muestras analizadas por año, procedencia y puesto de diagnóstico. Región Guapi-Cauca. 2014-2017.....	99
<b>Tabla 3-4:</b> Distribución de los haplotipos completos en cada gen por lugar de procedencia. Región Guapi-Cauca. 2014-2017.....	100
<b>Tabla 3-5:</b> Distribución de los haplotipos de las infecciones múltiples para cada gen. Región Guapi-Cauca. 2014-2017.....	107
<b>Tabla 3-6:</b> Genotipos en el gen <i>pfcr1</i> asociados a la resistencia a la cloroquina identificados en Colombia. ....	114
<b>Tabla 3-7:</b> Genotipos en el gen <i>pfdfhr</i> asociados a la resistencia a la pirimetamina identificados en Colombia. ....	119
<b>Tabla 3-8:</b> Genotipos en el gen <i>pfdhps</i> asociados a la resistencia a la sulfadoxina identificados en Colombia. ....	123
<b>Tabla 3-9:</b> Genotipos en el gen <i>pfmdr1</i> asociados a la resistencia/susceptibilidad a cloroquina, amodiaquina, lumefantrina y mefloquina identificados en Colombia.....	129
<b>Tabla 4-1:</b> Listado de los 18 antígenos de <i>P. falciparum</i> y <i>P. vivax</i> seleccionados para su expresión.....	146
<b>Tabla 4-2:</b> Listado de los antígenos de <i>P. falciparum</i> procedentes del London School of Hygiene and Tropical Medicine. ....	149
<b>Tabla 4-3:</b> Características demográficas y parasitológicas de la población de estudio. Santa Mónica y El Cuerval, Cauca. 2015- 2017. ....	153
<b>Tabla 4-4:</b> Antígenos de <i>P. vivax</i> y <i>P. falciparum</i> usados en la construcción de la variable dependiente “respuesta serológica”. Características generales y sus respectivos ortólogos. ....	158
<b>Tabla 4-5:</b> Distribución de los seropositivos para <i>P. falciparum</i> y para <i>P. vivax</i> de acuerdo con las variables demográficas, antecedentes y de laboratorio. Santa Mónica y El Cuerval, Cauca. 2015- 2017.....	161

<b>Tabla 4-6:</b> Modelo que mejor predice la seropositividad para <i>P. falciparum</i> y <i>P. vivax</i> . Santa Mónica y El Cuerval, Cauca. 2015 - 2017 .....	162
<b>Tabla 5-1:</b> Distribución de casos de infección por <i>P. falciparum</i> e IFA en Colombia, el Pacífico Caucaño, Guapi y El Cuerval. 2014 - 2017.....	183
<b>Tabla 5-2:</b> Distribución de los 207 casos positivos para malaria por localidad y año y la distancia con respecto a la zona urbana de Guapi. Región Guapi-Cauca. 2014-2017..	197
<b>Tabla 5-3.</b> Distribución de las subpoblaciones de parásitos por localidad de origen de los casos de malaria. Región Guapi-Cauca. 2014-2017. ....	199

## Introducción

La malaria es considerada la primera causa de enfermedad parasitaria a nivel mundial y aunque anualmente se invierten miles de millones de dólares en programas para su eliminación, este objetivo está lejos de alcanzarse. La transmisión de la malaria está relacionada con las pobres condiciones sociales y económicas de las poblaciones que la padecen, con inequidad y falta de acceso a servicios esenciales de atención y con la falta de cobertura universal de las intervenciones contra la enfermedad (WHO, 2014).

La Organización Mundial de la Salud en su Informe Mundial sobre el Paludismo de 2017 demuestra que, aunque la incidencia de casos de malaria a nivel mundial ha disminuido desde el año 2010, la tasa de disminución se ha estancado e incluso hay retrocesos en los logros en algunas regiones desde el año 2014. Para estos mismos periodos, las tasas de mortalidad han seguido un patrón similar. En el año 2016, se reportó un total de 216 millones de casos de malaria en 91 países, con un incremento de 5 millones de casos con relación al año 2015. La cifra de muertes a nivel mundial llegó a 445000, similar a lo informado en el año 2015 (WHO, 2017).

La malaria en Colombia representa una importante carga en la población general y genera altos costos económicos por atención, incapacidad y muerte en los pacientes que la padecen; sin embargo, Colombia es considerada como una zona de baja transmisión, pero con diferencias locales internas que hacen que el abordaje para el diseño de políticas de control y eliminación también sea particular. El Cauca es un departamento con un comportamiento epidemiológico de la malaria variable en los últimos 5 años e históricamente, la especie más frecuente causante de esta enfermedad ha sido *Plasmodium falciparum*. En este departamento, y de acuerdo con los Índices Parasitarios Anuales (IPA), los municipios de Guapi y Timbiquí son los que aportan el mayor número de casos de malaria en todos los periodos epidemiológicos y están clasificados como zonas de riesgo medio y alto para la transmisión de malaria por presentar índices

parasitarios anuales (IPA) entre 1 y 10 y mayores a 10 respectivamente (Rodríguez JC, et al., 2011).

Actualmente los objetivos de la Estrategia de Gestión Integrada (EGI) para la promoción, prevención y control de las Enfermedades Transmitidas por Vectores en Colombia 2012 – 2021 y el Plan Decenal de Salud Pública en Colombia son los de reducir en 80% de manera progresiva y sostenida la mortalidad por malaria en todas las entidades territoriales durante el periodo 2012-2021, reducir progresivamente en 50% la morbilidad por malaria en las áreas endémicas del país hasta el año 2021 y, para el mismo año, eliminar la transmisión periurbana de malaria en los 16 focos identificados en Colombia, trece de los cuales están ubicados en la Región Pacífica Colombiana. Una primera fase en las políticas de eliminación en el país, es identificar los focos en departamentos de baja transmisión, específicamente en municipios con malaria periurbana, siendo Guapi, Cauca, uno de los municipios seleccionados para esta fase (Ministerio de Salud y Protección Social, 2013; Ministerio de Salud y Protección Social y OPS, 2014).

Por otra parte, la malaria se asocia con mayor frecuencia a la presencia de manifestaciones clínicas, aunque se estima que alrededor de 75% de las infecciones son asintomáticas; algunas de ellas pueden progresar a infecciones sintomáticas en unos pocos días o semanas y otras pueden persistir asintomáticas durante meses; además, un porcentaje importante de las infecciones asintomáticas son submicroscópicas, es decir, detectables solo por diagnóstico molecular (Bousema T, et al., 2014). La parasitemia sexual o gametocitos, presentes en la circulación del huésped humano y que son las formas parasitarias infectantes para el vector y responsables del mantenimiento de la transmisión, también se encuentran en un porcentaje importante en forma submicroscópica; además, en infecciones asintomáticas con densidades parasitarias bajas, existe una mayor frecuencia de gametocitos (Bousema T, et al., 2014), lo cual es crucial en el mantenimiento natural de la infección.

El porcentaje de individuos con malaria asintomática dependerá del nivel de endemidad de la enfermedad en la región en la cual viven y del tiempo de residencia en la misma, lo cual determina el grado de exposición al parásito y el desarrollo de cierto nivel de inmunidad (Staalsoe T, Hviid L, 1998; Bousema JT, et al., 2004). De igual forma, la sensibilidad y especificidad de la técnica diagnóstica utilizada afectarán el número de casos confirmados de infección. El diagnóstico parasitológico convencional, utilizando la



microscopía de luz para la lectura de la gota gruesa, posee limitaciones propias de la prueba, lo cual genera un porcentaje variable de individuos que no son diagnosticados por esta técnica y que, además, pueden ser sintomáticos o no. Las pruebas basadas en el diagnóstico molecular son más específicas y sensibles para el diagnóstico de malaria, aunque son de difícil ejecución en el campo (Okell LC, et al., 2012). Otra aplicación de las técnicas de biología molecular es el uso reciente del análisis de regiones altamente polimórficas como los microsatélites o el análisis de polimorfismos de nucleótido único (SNPs), las cuales ofrecen la posibilidad de genotipificar al parásito y determinar, entre otros factores, el perfil de marcadores genéticos de resistencia a los antimaláricos, determinar la presencia de infecciones por uno o por múltiples genotipos del parásito en un humano y determinar la diversidad genética y la estructura de las poblaciones del parásito (Auburn S & Barry AE, 2017).

Por otra parte, el desarrollo de anticuerpos en el humano como parte de la respuesta inmune en malaria también dependerá del grado de exposición al parásito. La inmunidad adquirida en malaria solo ocurre después de varios años de infecciones repetidas y esta inmunidad protegerá frente al desarrollo de formas clínicas complicadas, pero no frente al desarrollo de la infección; por lo tanto, se espera que sea más frecuente la presencia de títulos de anticuerpos en adultos y niños mayores habitantes de zonas de alta transmisión para malaria (IPA>10) (El-Hassan I, et al., 1995; Giha HA, et al., 2000). La longevidad de los anticuerpos contra antígenos de *P. falciparum* es variable y permite estimar si la infección malárica es reciente o pasada (Corran P, et al., 2007). La serovigilancia en malaria, es decir, el uso de la respuesta de anticuerpos especie-específica contra *Plasmodium* como biomarcador, permite monitorear el nivel de exposición, la dinámica de transmisión y la respuesta inmune, con el fin de determinar el éxito o no de las estrategias encaminadas a la eliminación, además de determinar grupos de riesgo frente a infección malárica con el fin de caracterizar de forma correcta la dinámica de transmisión en un lugar definido (Corran PH, et al., 2007; Helb DA, et al., 2015).

Con el objetivo de determinar si la búsqueda activa de casos de malaria asintomática es una estrategia adecuada en un eventual proceso de eliminación de la malaria en Guapi-Cauca, Colombia y apoyados en el diagnóstico microscópico convencional, las pruebas de diagnóstico molecular y el estudio serológico, se propuso: 1). Estimar la prevalencia de malaria asintomática y portadores de gametocitos en el barrio Santa Mónica, Guapi-

Cauca y la vereda El Cuerval, Timbiquí-Cauca; 2). Determinar las características genotípicas y la estructura de población de los parásitos causantes de malaria sintomática en Guapi-Cauca; 3). Identificar grupos de riesgo para infección por malaria en el barrio Santa Mónica, Guapi-Cauca y la vereda El Cuerval, Timbiquí-Cauca. Esta información fue analizada en el contexto de las actuales políticas locales y mundiales encaminadas a la pre-eliminación y eliminación de la malaria, con el fin de establecer los lineamientos para el diseño de una estrategia orientada a la eliminación de esta enfermedad en el pacífico caucano.

## Referencias

Auburn S, Barry AE. Dissecting malaria biology and epidemiology using population genetics and genomics. *Int J Parasitol.* 2017 Feb;47(2-3):77-85. doi: 10.1016/j.ijpara.2016.08.006. Epub 2016 Nov 5.

Bousema JT, Gouagna LC, Drakeley CJ, Meutstege AM, Okech BA, Akim IN, Beier JC, Githure JI, Sauerwein RW: *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage in asymptomatic children in western Kenya. *Malar J.* 2004;3:18.

Bousema T, Okell L, Felger I, Drakeley C. Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. *Nat Rev Microbiol.* 2014 Dec;12(12):833-40. doi: 10.1038/nrmicro3364. Epub 2014 Oct 20.

Corran PH, Coleman P, Riley EM, Drakeley C. Serology: a robust indicator of malaria transmission intensity? *Trends Parasitol.* 2007;23(12):575–82.

El-Hassan I, Hviid L, Jakobsen P, Giha H, Satti GM, Arnot D et al. High proportion of sub-clinical *Plasmodium falciparum* infections in an area of seasonal and unstable malaria in Sudan. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995;53:78-83.

Giha HA, Giha HA, Rosthoj S, Dodoo D, Hviid L, Satii GM, Scheike T et al. The epidemiology of febrile malaria episodes in an area of unstable and seasonal transmission. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000;94:645-51.

Helb DA, Tetteh KK, Felgner PL, Skinner J, Hubbard A, Arinaitwe E, et al. Novel serologic biomarkers provide accurate estimates of recent *Plasmodium falciparum* exposure for individuals and communities. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Aug 11;112(32):E4438-47. doi: 10.1073/pnas.1501705112.

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.

Ministerio de Salud y Protección Social. Plan Decenal de Salud Pública 2012-2021: La salud en Colombia la construyes tú. Bogotá, 2013. Disponible en <https://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/Plan%20Decenal%20-%20Documento%20en%20consulta%20para%20aprobaci%C3%B3n.pdf>.

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. doi: 10.1038/ncomms2241.

Rodríguez JC, Uribe GÁ, Araújo RM, Narváez PC, Valencia SH. Epidemiology and control of malaria in Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011 Aug;106 Suppl 1:114-22.

Staalsoe T, Hviid L: The role of variant-specific immunity in asymptomatic malaria infections: maintaining a fine balance. *Parasitol Today* 1998, 14:177–178.

World Health Organization (WHO). From malaria control to malaria elimination. Geneva. 2014. Disponible en: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112485/9789241507028\\_eng.pdf?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112485/9789241507028_eng.pdf?sequence=1).

World Health Organization (WHO). World malaria report 2017. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259492/9789241565523-eng.pdf?sequence=1>.

# 1. Marco teórico

## 1.1 Situación epidemiológica de la malaria. Mundial, Regional, Local

La malaria o paludismo en humanos puede ser causada por 5 especies de parásitos pertenecientes al género *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi*. *P. falciparum* es la especie con mayor prevalencia mundial, está considerada como la más virulenta y está asociada con mayor frecuencia a casos complicados y mortales de la enfermedad (White NJ, et al., 2014). Para el año 2016, se consideró que *P. falciparum* fue la especie causante de 99% de los casos de malaria en África Subsahariana, mientras que *P. vivax* es el parásito predominante en la Región de las Américas y fue la especie responsable de 64% de los casos de malaria en esta región durante este mismo año (WHO, 2017).

En el año 2016 se reportaron casos autóctonos de malaria en 91 países, de los cuales 80% se registraron en India y África Subsahariana. A nivel mundial se registró una tendencia hacia la reducción de la transmisión entre los años de 2010 y 2016. Se estima que en el año 2010 hubo 237 millones de casos de malaria (Intervalo de Confianza (IC) 95%: 218-278 millones), mientras que para 2015 se estimaron 211 millones (95% IC: 192-257 millones) y para 2016 se calcularon 216 millones de casos (95% IC: 196-263 millones). Los valores de incidencia también disminuyeron durante el mismo periodo, pasando de 73 a 63 casos por cada mil habitantes en riesgo; esto significó una reducción promedio de 18% e incluso, en la región de Asia suroriental, se logró una disminución del 48% (WHO, 2017).

De igual forma se registró la reducción en la mortalidad por causa de la malaria entre los años 2010 y 2016, principalmente en Asia suroriental (44%), África (37%) y América (27%). Sin embargo, la tendencia a la baja se estancó entre 2015 y 2016; en estos años, se estimó un total mundial de muertes por malaria de 446000 y 445000, respectivamente.

Las regiones más afectadas fueron África, Asia Suroriental, el Pacífico Occidental, el Mediterráneo Oriental y América (WHO, 2017).

A pesar de la tendencia mundial hacia la disminución en la transmisión, incidencia y mortalidad por causa de la malaria, entre los años de 2014 y 2016 la región de las Américas siguió la tendencia inversa. En 2015 se registró un aumento de 16% con respecto a lo observado en 2014, año en el cual se registró el menor número de casos de malaria en las últimas cuatro décadas; por su parte, entre 2015 y 2016 la malaria aumentó en 26% en esta región (OMS. OPS, 2017). Se estima que en este continente, 102 millones de personas viven en áreas con algún riesgo y al menos 28 millones viven en zonas de alto riesgo de transmisión, con índices parasitarios anuales de más de 10 casos por cada 1000 habitantes (IPA>10). El número de casos en la región se redujo aproximadamente en un 62% entre el año 2000 y el 2015 (de 1.181.095 a 451.242 casos); también hubo una reducción similar (61,2%) en el número de muertes en el mismo período (de 410 a 159) (OMS. OPS, 2017).

Colombia y Haití aportan el mayor número de casos por *P. falciparum* en América. En el año 2000, Colombia fue el segundo país con mayor número de casos reportados en la región y en 2014 pasó a ser el cuarto después de Brasil, Venezuela y Perú. Sin embargo, entre 2015 y 2016 los casos por malaria se incrementaron en Colombia; este aumento está asociado a la finalización del proyecto para la eliminación de la malaria en la Región de las Américas, que estaba financiado por el Fondo Mundial y que terminó en 2014, ya que las intervenciones en materia de la red de diagnóstico y control vectorial se vieron reducidas luego del fin del proyecto (OMS. OPS, 2017).

En general, Colombia es una zona de transmisión baja e inestable pero existen cuatro zonas de alta transmisión con IPA>10: la Región Pacífica, la zona del Urabá - Bajo Cauca - Alto Sinú, la Orinoquía y la Amazonía. Por otra parte, y de acuerdo con una tendencia histórica, cinco de los 32 departamentos concentran alrededor del 70% de los casos de malaria: Chocó, Córdoba, Antioquia, Valle y Cauca y las infecciones por *P. vivax* representan cerca de 65% de los casos de malaria. Durante el año 2016, más del 65% de los casos de malaria fue reportado en la Región Pacífica y de ellos, 55% son atribuidos a la infección por *P. falciparum*. En el año 2016 se registró un incremento de 60,4% en los casos en esta región con respecto al año 2015 y Choco, Nariño y Buenaventura registraron los índices parasitarios anuales (IPA) más altos para el 2016

en esta región (INS, 2016). En el año 2017 se registró una reducción de casos en esta región de 45,7%, siendo Nariño, Choco y Cauca, los departamentos con IPA más altos en este año (INS, 2017). La distribución de casos de malaria coincide tanto con el mapa de los asentamientos afrocolombianos de la Región Pacífica y los valles interandinos, como con el mapa de pobreza en Colombia (PNUD, 2012).

Las zonas de alta transmisión en Colombia albergan predominantemente población afrocolombiana, comunidades indígenas y población mestiza. La Región Pacífica colombiana es una de las más pobres del país y presenta serios problemas de acceso a los servicios de salud y la malaria representa un impacto negativo en sus pobladores. Esta región se caracteriza por los altos índices de movilidad humana asociados tanto a actividades económicas como la pesca, la agricultura o la minería legal o ilegal como a desplazamientos forzosos debidos al conflicto armado, factores que incrementan la posibilidad de contacto humano-vector y en consecuencia los casos de malaria (PNUD, 2012). Además, un elevado porcentaje de pobladores de esta región corresponden a población afro-colombiana con altas frecuencias de factor Duffy negativo y deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH) lo cual se correlaciona con mayor frecuencia de infecciones por *P. falciparum* debido al factor protector que provoca el factor Duffy negativo para la infección por *P. vivax* y al mayor riesgo de anemia hemolítica asociada a la deficiencia de G6PDH y secundaria al uso de antimaláricos como la primaquina (Herrera S, et al., 2005).

En conclusión, la Región Pacífica colombiana combina diversos escenarios epidemiológicos, asociados a factores conductuales, socioeconómicos y genéticos humanos que acompañados de las características ecológicas de la región, las cuales favorecen la presencia de criaderos del vector, se traduce en condiciones favorables para la transmisión efectiva de la malaria.

### **1.1.1 El municipio de Guapi y la situación de la malaria**

Guapi es uno de los tres municipios de la Costa Pacífica caucana, siendo el más suroccidental de ellos, ubicado a 2°34'11"N 77°53'10"O, cuya máxima altitud es de 5 msnm, posee una temperatura promedio de 29°C y una superficie de 2688 Km<sup>2</sup>. Está ubicado a orillas del río Guapi, el promedio anual de precipitaciones está entre 4000 y 6000 mm<sup>3</sup>, con valores máximos entre mayo y junio y mínimos entre noviembre y

diciembre y la humedad relativa fluctúa entre 80% y 95% (Ministerio del Trabajo, 2013). Según la proyección del DANE y de acuerdo con el censo de 2005, para el año 2013 el municipio estaba conformado por 29555 habitantes, 97% comunidades afrocolombianas, 0,5% indígenas (resguardo de Bellavista) y 2,5% mestizos. En el censo del año 2005, la población urbana era de 16573 habitantes y la rural de 12076 habitantes (Departamento Administrativo Nacional de Estadística-DANE).

El municipio de Guapi, es uno de los lugares priorizados en las políticas nacionales para la eliminación de la malaria, debido a la presencia de malaria urbana y a la alta carga de esta enfermedad en la situación de salud de los pobladores de la región (Programa Nacional para PyP ETV, 2017). Guapi es el segundo municipio más pobre de la Región Pacífica y sus habitantes, al igual que el resto de los residentes de esta región, enfrentan condiciones de exclusión y pobreza extrema, registran índices elevados de morbilidad y mortalidad por enfermedad general en todos los grupos de edad y los peores indicadores en relación al acceso al servicio de salud. Timbiquí y Guapi aportan el mayor porcentaje de casos de malaria en el departamento del Cauca y, en el caso de Guapi, la malaria afecta tanto la zona urbana como la rural (Ministerio de Salud y Protección Social, 2016).

Históricamente la malaria en Guapi es causada casi exclusivamente por *P. falciparum*. Como antecedente previo al desarrollo del presente trabajo, en el periodo comprendido entre 2007 y 2014 se evidenció una tendencia hacia la reducción de casos de malaria, presentando los niveles más bajos en 2012, con un aumento posterior en los años 2013 y 2014. Utilizando los datos del DANE del censo de 2005, si se considera como población de riesgo a la totalidad de la población rural (12076 habitantes) y 50% de la población urbana (8286), los índices parasitarios para los casos totales y por *P. falciparum*, clasifican a este municipio en una zona de riesgo medio y alto para la transmisión de malaria en el período entre 2007 y 2014, es decir, presenta índices parasitarios entre 1 y 10 y mayores a 10 respectivamente. Esta información se resume en la Tabla 1-1.



**Tabla 1-1:** Comportamiento de la malaria en el municipio de Guapi, Cauca, 2007 – 2014, por especie parasitaria.

Malaria / índices	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Malaria complicada	0	0	2	0	0	0	0	3
Malaria mixta	1	1	1	1	0	0	4	1
<i>P. falciparum</i>	809	455	601	246	150	73	356	413
<i>P. vivax</i>	17	8	18	6	7	0	7	2
Total malaria	827	464	620	253	157	73	367	416
IPA <sup>1</sup>	40,6	22,8	30,4	12,4	7,7	3,6	18,0	20,4
IFA <sup>2</sup>	39,7	22,3	29,5	12,1	7,4	3,6	17,5	20,3
IVA <sup>3</sup>	0,8	0,4	0,9	0,3	0,3	0,0	0,3	0,1

Fuente: Felipe Castillo. ETV. Secretaría de Salud del Cauca.

<sup>1</sup>IPA: índice parasitario anual <sup>2</sup>IFA: índice por *P. falciparum* anual. <sup>3</sup>IVA: índice por *P. vivax* anual.

### 1.1.2 La malaria asintomática. Definición y contexto epidemiológico

La malaria asintomática se define como la presencia de formas asexuales de *Plasmodium* en sangre periférica en ausencia de manifestaciones clínicas. El diagnóstico de la malaria asintomática puede realizarse a través de los métodos convencionales de diagnóstico como la microscopía de luz o con pruebas moleculares como la PCR cuya sensibilidad y especificidad son bastante altas comparado con la microscopía. La malaria asintomática indetectable a través de la microscopía de luz, pero evidente a través de pruebas moleculares como la PCR se denomina malaria submicroscópica (OMS, 2017 [a]).

La malaria se asocia con la presencia de manifestaciones clínicas relacionadas con la infección por cualquiera de las especies de *Plasmodium* que afectan a los humanos; sin embargo, se estima que alrededor de 75% de las infecciones por malaria son asintomáticas. Algunas de estas infecciones pueden progresar y producir síntomas en unos pocos días o semanas y otras pueden persistir asintomáticas durante meses; además, un porcentaje importante de las infecciones asintomáticas son submicroscópicas (Bousema T, et al., 2014).

La proporción de infecciones submicroscópicas, que en su gran mayoría son asintomáticas, es inversamente proporcional a la intensidad de transmisión de la región; se ha descrito que en zonas de alta transmisión de malaria la proporción de infecciones submicroscópicas es del 20% mientras que en zonas de baja transmisión la proporción varía entre 70 y 80%. La alta proporción de infecciones submicroscópicas en zonas de baja transmisión posiblemente se debe al desarrollo de inmunidad residual como consecuencia de la exposición repetida a bajas parasitemias y a la baja proporción de infecciones múltiples, fenómenos que son frecuentes en estas regiones (Bousema T, et al., 2014). Este fenómeno es evidente de igual forma en escenarios en los cuales las medidas de intervención han generado cambios en la proporción de casos de malaria y se ha pasado de zonas de alta a baja transmisión, en las cuales particularmente la infección submicroscópica se hace prevalente, siendo explicado este fenómeno por la inmunidad residual en la población, lo cual asegura el mantenimiento de densidades parasitarias a niveles submicroscópicos (Bousema T, et al., 2014).

Los reportes de la prevalencia de la malaria asintomática, diagnosticada por microscopía, PCR o pruebas de diagnóstico rápido, muestran grandes variaciones. Para las Américas, se han registrado valores entre 0 y 38,5% (Alves FP, et al., 2002; Marcano TJ, et al., 2004; Cerutti C Jr, et al., 2007; Fugikaha E, et al., 2007; Tada MS, et al., 2007; Suárez-Mutis MC, et al., 2007; Roper MH, et al., 2000; Roshanravan B, et al., 2003; Branch O, et al., 2005; Cucunubá ZM, et al., 2008; Cucunubá ZM, et al., 2013; Osorio L, et al., 2004), para África entre 0 y 90% (Owusu-Agyei S, et al., 2001; Crookston BT, et al., 2010; John CC, et al., 2009; Bousema JT, et al., 2004; Njama-Meya D, et al., 2004; Le Port A, et al., 2008; Klein Klouwenberg PM, et al., 2005; Nkoghe D, et al., 2011; Eke RA, et al., 2006; Achidi EA, et al., 1995), para Oriente Medio entre 0 y 12,8% (Bin Mohanna MA, et al., 2007) y para otras regiones de Asia entre 0,1 y 9,5% (Coleman RE, et al., 2002; Richards AK, et al., 2007; Fernando SD, et al., 2009). También se han registrado prevalencias para la malaria asintomática en zonas de pre-eliminación y eliminación que varían entre 0 y 95% (Zoghi S, et al., 2012; Harris I, et al., 2010; Lee PW, et al., 2010). Estos hallazgos contrastan con lo explicado por Bousema T y colaboradores (2014) con respecto a la proporción de infecciones asintomáticas, quien concluye que las infecciones submicroscópicas particularmente son más prevalentes en zonas de baja transmisión. Además, las variaciones en las prevalencias de malaria asintomática a nivel mundial

pueden explicarse por la diversidad de metodologías empleadas para la selección de individuos y por la variación en los niveles de sensibilidad de la prueba diagnóstica.

La Región de las Américas es quizás una de las zonas en el mundo en la cual se tiene mejor documentada la malaria asintomática, particularmente en Perú y Brasil, países pertenecientes a la Subregión de Amazonas, donde también se encuentra Colombia. En estudios realizados en Iquitos, Perú y en Rondonia, Brasil, se reporta que la PCR es más eficiente para el diagnóstico de malaria y que hay una mayor proporción de casos de infección asintomática que sintomática, siendo similares estos hallazgos tanto para *P. falciparum*, como para *P. vivax* en los dos países (Alves FP, et al., 2002; Roshanravan B, et al., 2003). En Perú las prevalencias de malaria asintomática detectadas por microscopía están entre 2,4 y 4,2% y por PCR la prevalencia reportada es 17,6% (Roper MH, et al., 2000; Roshanravan B, et al., 2003). En Brasil las prevalencias de malaria asintomática detectadas por microscopía, PCR o ambas están entre 6,4 y 21,7%, siendo la PCR entre 7 y 7,5 veces más eficiente para la detección de infecciones maláricas (Alves FP, et al., 2002); también en Brasil, las prevalencias obtenidas por especie de parásito están entre 1,5 y 10,4% para *P. vivax* y entre 0,5 y 7,2% para *P. falciparum*, usando PCR o microscopía (Cerutti C, et al., 2007; Tada MS, et al., 2007).

Particularmente para Colombia, la evaluación de la malaria asintomática como problemática que debe ser abordada al momento de diseñar las políticas de reorientación de los programas con miras a la eliminación de la malaria (Blair S, 2012), se ha documentado en diferentes estudios orientados específicamente al diagnóstico de dicha condición:

- Quibdó, Chocó (2001). En 223 niños escolares, la prevalencia fue 0% para infección asintomática por malaria utilizando microscopía (Osorio L, et al., 2004).
- Tierralta, Córdoba (2006). Selección aleatoria de individuos y con seguimiento a 28 días. En 212 individuos de Nuevo Tay, Tierralta por microscopía y PCR la prevalencia de infección asintomática por *Plasmodium spp.* fue 14,6% (31/212; 95% CI: 9,6-19,6%) y por especie fue de 20/31; 64,5% para *Plasmodium vivax*, 9/31; 29% para *Plasmodium falciparum* y 2/31; 6,5% para la infección mixta (Cucunubá ZM, et al., 2008). Específicamente la prevalencia de infección asintomática al día 0 en Tierralta fue de 11,3% (95% CI 7,2–16,8) por microscopía y 16,5% (95% CI 11,5–22,9) por PCR (Cucunubá ZM, et al., 2013).

- Tumaco, Nariño (2007). Selección aleatoria de individuos. En el día 0 la prevalencia por microscopía fue de 2,4% (95% CI 0,7–5,5) y 5,8% (95% CI 2,3–9,2) por PCR (Cucunubá ZM, et al., 2013).
- Tierralta, Córdoba; Buenaventura, Valle del Cauca y Tumaco, Nariño (2011, 2013, 2014). Posterior a la selección aleatoria de viviendas mediante qPCR. Las prevalencias de infección asintomática durante cada uno de estos años, respectivamente en Tierralta fueron 15%, 10% y 5%; en Buenaventura 12%, 7% y 4% y en Tumaco fueron 4%, 7% y 2% (Vásquez-Jiménez JM, et al., 2016).

Con el fin de interpretar correctamente los datos de los estudios en Colombia, es necesario considerar, entre otros factores, el diseño y la metodología de selección de individuos (por ejemplo, búsqueda activa vs búsqueda reactiva), nivel de sensibilidad de la prueba diagnóstica utilizada y momento epidemiológico de transmisión.

La caracterización de la malaria asintomática en una zona específica, no solo da cuenta de las características de transmisión en una zona particular, definiendo el tipo de reservorio, sino que además permite orientar de forma más precisa las políticas de control y eliminación de la malaria, esto último enfocado a zonas de baja transmisión en las cuales la identificación y tratamiento farmacológico de los reservorios es una estrategia novedosa (Sturrock HJ, et al., 2013; Mosha JF, et al., 2013). De forma más precisa y detallada, la descripción de la infección asintomática por malaria permite la definición de los llamados “puntos críticos” o “puntos calientes” en una pequeña área geográfica, en la cual los habitantes pueden estar expuestos de manera diversa a la picadura de los vectores, de tal manera que la distribución de los casos no es uniforme en una región determinada (Sturrock HJ, et al., 2013; Mosha JF, et al., 2013).

La vigilancia de la malaria asintomática es considerada una estrategia fundamental como parte de los programas integrados para el control y la eliminación de la malaria en el mundo, pues es claro que el efecto fundamental de esta condición es el aumento de la probabilidad de la producción de gametocitos en el humano, convirtiéndose en fuente de infección para el mosquito vector, perpetuando de esta forma la infección en la naturaleza. El estudio de la malaria asintomática es fundamental para mejorar el conocimiento sobre las dinámicas de transmisión y para el diseño de estrategias de control y eliminación de la malaria (Laishram DD, et al., 2012). El diagnóstico de la malaria asintomática es considerado también un indicador en el monitoreo de los

resultados de intervención con miras a la eliminación de la malaria en zonas en donde previamente se reportaban casos, además de ser útil en la prevención de la reintroducción de casos nuevos de malaria, dado que la identificación precoz y el tratamiento oportuno de estos casos limitaría el restablecimiento de la transmisión de la enfermedad en zonas en proceso de eliminación (Fernando SD, et al., 2009). En los focos de transmisión de malaria, esto se traduce en una evaluación favorable de la aplicación de una estrategia si se logra documentar la ausencia de casos nuevos o la ausencia de genotipos del parásito diferentes a los esperados, según lo que se haya identificado anteriormente a partir de los estudios moleculares específicos y que se basen en la vigilancia epidemiológica y molecular tanto de la infección asintomática como sintomática.

### **1.1.3 La herramienta serológica en la vigilancia en malaria**

Como parte de las políticas de eliminación de la malaria en los países en los cuales la enfermedad es endémica, se necesitan herramientas para medir el riesgo y el nivel de exposición a la infección, pues esto permite evaluar el impacto de las intervenciones. Para ello, los sistemas de salud rutinariamente utilizan la medición de la incidencia de la malaria en un lugar y momentos determinados (por ejemplo semanas epidemiológicas); sin embargo, en algunos lugares este método subestima la incidencia real de la infección debido a factores como la calidad del entrenamiento del personal encargado del diagnóstico, la falta de una adecuada red de diagnóstico y el nivel de detección de las pruebas utilizadas, principalmente en los casos de infecciones asintomáticas y con niveles submicroscópicos, entre otras razones (Cibulskis RE, et al., 2009). Otra herramienta bastante precisa es el uso de la tasa de inoculación entomológica (TIE), entendida como el número de picaduras infectantes por individuo por unidad de tiempo, la cual ofrece información sobre parámetros del vector y del humano. Sin embargo, el proceso de obtención de datos es exigente y costoso, en ocasiones los resultados pueden ser difíciles de interpretar y los procedimientos requieren de estandarizaciones que no se pueden realizar rutinariamente; además, en zonas de baja transmisión la probabilidad de encontrar vectores infectados es baja, por lo cual esta medida resulta casi imposible de obtener (Smith DL, et al., 2005; Hay SI, et al., 2000).

La serovigilancia en malaria es el uso de la respuesta de anticuerpos especie-específica contra *Plasmodium* como un marcador para monitorear el nivel de exposición, la

dinámica de transmisión y la respuesta inmune, con el fin de determinar el éxito o no de las estrategias encaminadas a la eliminación. La respuesta inmune en malaria se establece después de varios años de infecciones repetidas y solo protege frente al desarrollo de formas clínicas complicadas de la enfermedad pero no frente al desarrollo de la infección, por lo cual no se considera permanente ni protectora (El-Hassan I, et al., 1995; Giha HA, et al., 2000). Sin embargo, la respuesta de anticuerpos ofrece información sobre el tiempo de exposición (infección reciente vs pasada) y las tasas de seroconversión y seronegativización (edad a la cual la población presenta anticuerpos frente a un antígeno específico y el tiempo necesario para que la respuesta de anticuerpos desaparezca) lo que permite conocer el grado de exposición al parásito y genera datos útiles para los sistemas de vigilancia en malaria. Para ello, es necesario contar con un conjunto de antígenos lo suficientemente numeroso que permita discriminar adecuadamente el tipo de respuesta en todos los grupos de edad y diseñar estudios epidemiológicos sólidos que proporcionen resultados confiables. Al incorporar los datos serológicos a los análisis podría mejorarse la precisión de la medida de incidencia en malaria, disminuyendo también los costos de los procedimientos, si se comparan con aquellos conducentes a obtener la TIE (Helb DA, et al., 2015). De este modo, se ha descrito la utilidad potencial de la serovigilancia en malaria para determinar el nivel de riesgo de una población, identificar individuos con exposición reciente (facilitando así la identificación de casos de reintroducción de la infección o reemergencia), confirmar la eliminación de la malaria y la efectividad de las medidas de control, identificar áreas de mayor riesgo de exposición (puntos calientes) o individuos con mayor riesgo de infectarse y monitorear individuos portadores asintomáticos de la infección, entre otras aplicaciones (Elliott SR, et al., 2014). Es importante aclarar como lo puntualiza Elliott SR y colaboradores (2014), que aún se requiere el diseño de estudios destinados a identificar los mejores biomarcadores de inmunidad y biomarcadores de exposición. Particularmente en zonas en donde se reduce la transmisión y aumenta la proporción de población susceptible por pérdida de la inmunidad parcialmente protectora, es necesario contar con un biomarcador de inmunidad que identifique esta población en riesgo. De igual forma, se requiere definir con precisión los factores que afectan la aparición y el mantenimiento de los biomarcadores de exposición y su relación con la medida de transmisión en un lugar determinado.

Entre los aspectos que deben considerarse para la implementación de los estudios de serovigilancia están la complejidad técnica, los costos, el rendimiento de la prueba, la interacción entre los reactivos (competitividad, reacciones cruzadas), las características de la muestra (papel de filtro o suero) y sus métodos de obtención (invasivo o no). En los estudios de serovigilancia pueden utilizarse ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) que son técnicas de bajo costo, fáciles de realizar, que funcionan con un número pequeño de antígenos y que pueden ser realizadas a partir de muestras de sangre almacenadas en papel de filtro. Sin embargo, si se requiere mayor precisión en aspectos relacionados con la detección de cambios serológicos en lapsos cortos de exposición o en periodos de cambios de exposición producto de intervenciones de control, es necesario utilizar otras técnicas para analizar un número mayor de antígenos. El uso de micromatrices (microarrays) de proteínas permite este tipo de análisis, la flexibilización en la representatividad y en la estratificación de la muestra por edad (propio de los estudios con modelos analíticos destinados a determinar las tasas de seroconversión y serorreversión) y la posibilidad de evaluar una muestra pequeña de individuos expuestos. La implementación de esta técnica es más compleja y costosa y su uso es posible solo si se logra la estandarización adecuada en la selección de los antígenos que permita obtener estimadores muy cercanos del nivel real de exposición a la malaria. Entre los aspectos técnicos de este tipo de pruebas, se debe prestar especial atención al diseño de las proteínas, pues su plegamiento inadecuado puede interferir con la respuesta (Helb DA, et al., 2015), como sucede en cualquier técnica basada en la detección de anticuerpos. Algunos de los antígenos más utilizados en los estudios de seroprevalencia se presentan en la Tabla 1-2.

**Tabla 1-2:** Antígenos de *Plasmodium* utilizados con frecuencia en los estudios de seroprevalencia (Elliott SR, et al., 2014).

<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i> y <i>P. vivax</i>
Antígeno de unión al eritrocito 175 (EBA 175)	Proteína de unión al factor Duffy (DBP)	Proteína de membrana apical 1 (AMA1)
Antígeno variante de superficie 2 que interactúa con condroitín sulfato A (VAR2CSA)	Proteína de unión al reticulocito 1 (RBP1).	Proteína del circosporozoíto (CSP)
	PvMSP 1 -19.	Proteínas de superficie del merozoíto 1 y 3 (MSP1) (MSP 3).
Proteína homóloga de unión al reticulocito 2 (PfRH2).		
PfMSP 1 – 19 <sup>1</sup>		
PfMSP1 – 42		
Proteína rica en glutamato (PfGLURP)		
Antígenos de estadio hepático 1 (LSA 1)		
Proteína de unión relacionada con tromboplastina (TRAP).		

<sup>1</sup>La respuesta de anticuerpos a los antígenos PfMSP 1 – 19 ha sido utilizada como un estimador de incidencia de malaria, de TIE, identificación de puntos calientes y cambios en la intensidad de transmisión en el tiempo en zonas de baja transmisión. En estos casos es necesario evaluar posibles reacciones cruzadas en antígenos ortólogos presentes en *P. vivax*.

La aplicabilidad de estos antígenos es variable. Por ejemplo, AMA1 se usa en población infantil para evaluar respuesta precoz a la infección o en casos en los cuales se requiere monitorear zonas de baja transmisión; en zonas de moderada transmisión es más útil EBA-175. De igual forma se debe tener presente la reactividad cruzada de los antígenos, sobre todo en zonas en las cuales circulan tanto *P. falciparum* como *P. vivax* (Elliott SR, et al., 2014).

El uso de micromatrices de proteínas aumenta el espectro de antígenos candidatos a biomarcadores en estudios serológicos, de tal forma que para discriminar escenarios de



baja y alta transmisión se han utilizado, entre otros, MSP4, MSP5, la proteína de superficie del merozoíto relacionada con la proteína de unión al antígeno Duffy (DBL-MSP) y la proteína exportadora 1 (EXP1) (Baum E, et al., 2013).

#### **1.1.4 Diagnóstico de las infecciones por *Plasmodium***

Dado que existe una asociación entre las densidades parasitarias y la sintomatología de la infección malarica, la sensibilidad de los métodos de diagnóstico y detección es una variable esencial para la identificación de los individuos infectados. En la búsqueda de individuos sin manifestaciones clínicas y portadores de formas parasitarias de *Plasmodium*, se entra a resolver el dilema de la sensibilidad de la técnica empleada, lo cual permite definir el concepto de la malaria submicroscópica, entendida como la infección por alguna de las especies de *Plasmodium* con parasitemia por debajo del nivel de detección microscópico. Aunque existe una correlación lineal en la capacidad de detección del parásito entre la microscopía y la PCR, es claro que las técnicas moleculares, específicamente la PCR, son técnicas altamente sensibles y específicas para el diagnóstico de infecciones por *Plasmodium* (Okell LC, et al., 2012).

La confirmación por el laboratorio del diagnóstico presuntivo de malaria tiene algunos inconvenientes, pues para obtener sensibilidades y especificidades superiores a 95% con la microscopía de luz convencional, se debe asegurar una adecuada calidad de los reactivos y un personal entrenado correctamente, lo cual no sucede en todos las regiones endémicas (Bottius E, et al., 1996). Además, hay estudios que reportan hasta dos terceras partes de mayor positividad de casos con PCR que con microscopía de luz convencional (de Andrade AL, et al., 1995; Bottius E, et al., 1996; Eke RA, et al., 2006; Dal-Blanco MP, et al., 2007), aunque se deben considerar las ventajas y desventajas en la realización de cada una de estas pruebas de laboratorio.

La microscopía ha servido para diagnosticar y confirmar casos de malaria y constituye una herramienta muy importante, pues sirve de referencia de medición epidemiológica para la determinación de prevalencias a nivel mundial. Sin embargo, su sensibilidad no es suficiente para detectar una gran proporción de infecciones asintomáticas submicroscópicas. A manera de ejemplo, mientras que la densidad parasitaria en sangre en áreas de moderada transmisión oscila entre 1 y 1000 parásitos/ $\mu$ l de sangre y la densidad de gametocitos maduros es menor a 100 gametocitos/ $\mu$ l de sangre, la microscopía detecta usualmente entre 5 a 10 parásitos/ $\mu$ l de sangre, las pruebas

moleculares basadas en la amplificación por PCR de ácidos nucleicos (ARN o ADN) son más sensibles que la microscopía y detectan entre 0,01-0,2 parásitos/ $\mu$ l. Por lo tanto es esencial poder identificar no solo la prevalencia de asintomáticos sino la prevalencia de gametocitos en las infecciones asintomáticas. Es importante aclarar que la microscopía convencional no es lo suficientemente sensible para la detección de gametocitos, a diferencia de las técnicas de biología molecular que usan la extracción de ARNm para su diagnóstico, aunque este tipo de técnicas requieren el seguimiento de estrictas recomendaciones en las condiciones de tiempo y temperatura en el almacenamiento de la muestra (Bousema T, et al., 2014).

### ▪ **Microscopía de luz. Diagnóstico parasitológico**

Es la detección de formas parasitarias de *Plasmodium* en sangre periférica y es considerado el diagnóstico parasitológico confirmatorio por excelencia en malaria. Las técnicas convencionales son el extendido de sangre periférica y la gota gruesa, ésta última considerada como el método de rutina más utilizado a nivel mundial para el diagnóstico, además de ser la primera opción diagnóstica que permite la identificación de formas y características parasitarias lo cual conduce a la identificación de la especie o especies implicadas en la infección. El principio de la técnica se basa en la coloración de la lámina con derivados de Romanowsky y la observación microscópica posterior, con el fin de determinar características morfológicas propias de cada especie del género *Plasmodium*. Con la gota gruesa además es posible calcular y estimar la parasitemia, factor determinante en la elección del tratamiento y en el pronóstico del paciente. Si se cuenta con un observador adecuadamente entrenado y con reactivos de coloración de buena calidad, la gota gruesa posee mayor sensibilidad que el extendido y las pruebas de diagnóstico rápido. El nivel más bajo de detección de la gota gruesa es del orden de 5 a 10 parásitos/ $\mu$ l de sangre (WHO, 2010; Ministerio de la Protección Social, 2010). En Colombia sigue siendo la prueba de oro recomendada para el diagnóstico de la malaria y utilizada en la Red de Microscopistas a nivel nacional (Ministerio de la Protección Social, 2010).

### ▪ **Pruebas de diagnóstico rápido (PDR). Inmunocromatográficas**

Las pruebas de diagnóstico rápido son pruebas inmunológicas (inmunocromatográficas) que detectan antígenos específicos de *Plasmodium* [proteína 2 rica en histidina (HRP2) o

la lactato-deshidrogenasa específica del parásito (pLDH)], a través del cambio de color en una tira de nitrocelulosa absorbente (WHO, 2010).

Las pruebas de diagnóstico rápido ofrecen la ventaja de que se aplican rápidamente y requieren un menor número de técnicos de laboratorio capacitados en casos de epidemias, comparados con la técnica de la gota gruesa. Sin embargo, la termoestabilidad puede ser un problema y puede haber resultados falsos negativos. También y como desventajas, estas pruebas son de mayor costo, no hacen diagnóstico de infección mixta, sólo algunas de ellas distinguen las especies diferentes a *P. falciparum* como causantes de la infección, el nivel de detección es más bajo que la gota gruesa (40-100 parásitos / $\mu$ l), y la sensibilidad y especificidad disminuye en parasitemias bajas, además de persistir la positividad a pesar de la administración correcta y efectiva del tratamiento antimalárico. La experiencia actual con las PDR indica que son útiles para confirmar la causa y el final de una epidemia de malaria (WHO, 2010).

En Colombia estas pruebas han sido evaluadas en el marco de las actividades de la Red Nacional de Malaria y como parte de diferentes trabajos de investigación y han tenido buen desempeño en campo, principalmente para el diagnóstico de *P. falciparum* (Mendoza NM, et al., 2013; Herrera S, et al., 2014). Se han detectado dificultades en los casos de parasitemias bajas y en la diferenciación de infecciones mixtas debido, entre otras razones, a la delección de los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* (Pava Z, et al., 2010; Murillo Solano C, et al., 2015).

### ▪ **Técnicas de biología molecular. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La PCR es altamente sensible y específica en el diagnóstico de infecciones por cualquiera de las especies de *Plasmodium*. Además de permitir el diagnóstico de infecciones mixtas, tiene un nivel de detección alto (0,01-0,2 parásitos/ $\mu$ l), es semi-cuantitativa, hace diferencia de estadios sexuales y asexuales del parásito, es posible hacer el diagnóstico de infecciones causadas por diferentes genotipos parasitarios (infecciones policlonales) y permite describir la aparición y el comportamiento de los genes asociados a la resistencia del parásito a los medicamentos. Por otro lado y como desventajas potenciales se pueden citar su alto costo, la necesidad de contar con personal entrenado y equipo especializado para su realización, la susceptibilidad de

contaminación durante el procedimiento en el laboratorio llevando al reporte de falsos positivos o negativos y sus resultados no son tan rápidos como se desearía en el diagnóstico de un caso febril al cual se le sospecha malaria (WHO, 2010).

Para el diagnóstico y tipificación de género y especie se utiliza la técnica de PCR anidada en la que se usan secuencias genómicas repetidas y conservadas; el uso de estas pruebas ha demostrado buenos resultados a partir de muestras en papel de filtro y mayor sensibilidad y especificidad que la microscopía (Li P, et al., 2014). En la actualidad también se dispone de PCR cuantitativas, amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA, por sus siglas en inglés) y PCR no cuantitativa y cuantitativa para detección de ARN a través de transcriptasa inversa (RT-PCR y qRT-PCR) (Bousema T, et al., 2014). Se ha reportado mejor sensibilidad de la PCR en tiempo real comparado con la microscopía y la PCR anidada convencional (Wang B, et al., 2014). La PCR directa basada en la detección de la citocromo oxidasa III, es un método que ha demostrado ser adecuado en la detección de infecciones microscópicas y sub-microscópicas de *Plasmodium*, siendo de gran utilidad al momento de evaluar un número considerable de muestras, pues no requiere la extracción de ADN parasitario y permite diferenciar todas las especies causantes de malaria en humanos (Echeverry DF, et al., 2016). Para la detección de gametocitos, se utiliza la extracción del ARNm del parásito y la detección de blancos de amplificación a través del uso de RT-PCR y qRT-PCR. Los blancos de amplificación más usados son: *Pfs25*, *Pfg377*, *Pfs230* (Bousema T, et al., 2014).

En Colombia, las técnicas moleculares para diagnóstico de la malaria han sido utilizadas en diversos estudios, en los cuales se ha reportado niveles de sensibilidad superiores a los informados por microscopía (Montoya AE, et al., 2008; Cucunubá ZM, et al., 2008; Taylor BJ, et al., 2011; Mendoza NM, et al., 2013; Herrera S, et al., 2014).

### ▪ **Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (LAMP)**

LAMP, es otra técnica de biología molecular que amplifica ácidos nucleicos, utilizando equipos de menor complejidad y en menor tiempo que una PCR convencional. Hay kits disponibles comercialmente para el diagnóstico del género *Plasmodium* y secuencias específicas para *P. falciparum* (Hopkins H, et al., 2013; Polley SD, et al., 2010). Esta técnica ofrece resultados cualitativos y su sensibilidad y especificidad es cercana a la de

una PCR anidada (Sema M, et al., 2015). La mayor ventaja es la capacidad de detección de pequeñas cantidades del ADN del parásito en un mínimo volumen de muestra (Aydin-Schmidt B, et al., 2014). En Colombia, esta técnica ha sido probada en Tierralta, Córdoba, evidenciando sensibilidad y especificidad comparables con la PCR en tiempo real y superiores a los datos obtenidos con la microscopía para el diagnóstico tanto de *P. falciparum* como de *P. vivax* y principalmente en el caso de las infecciones asintomáticas (Vallejo AF, et al., 2015).

## 1.2 El parásito

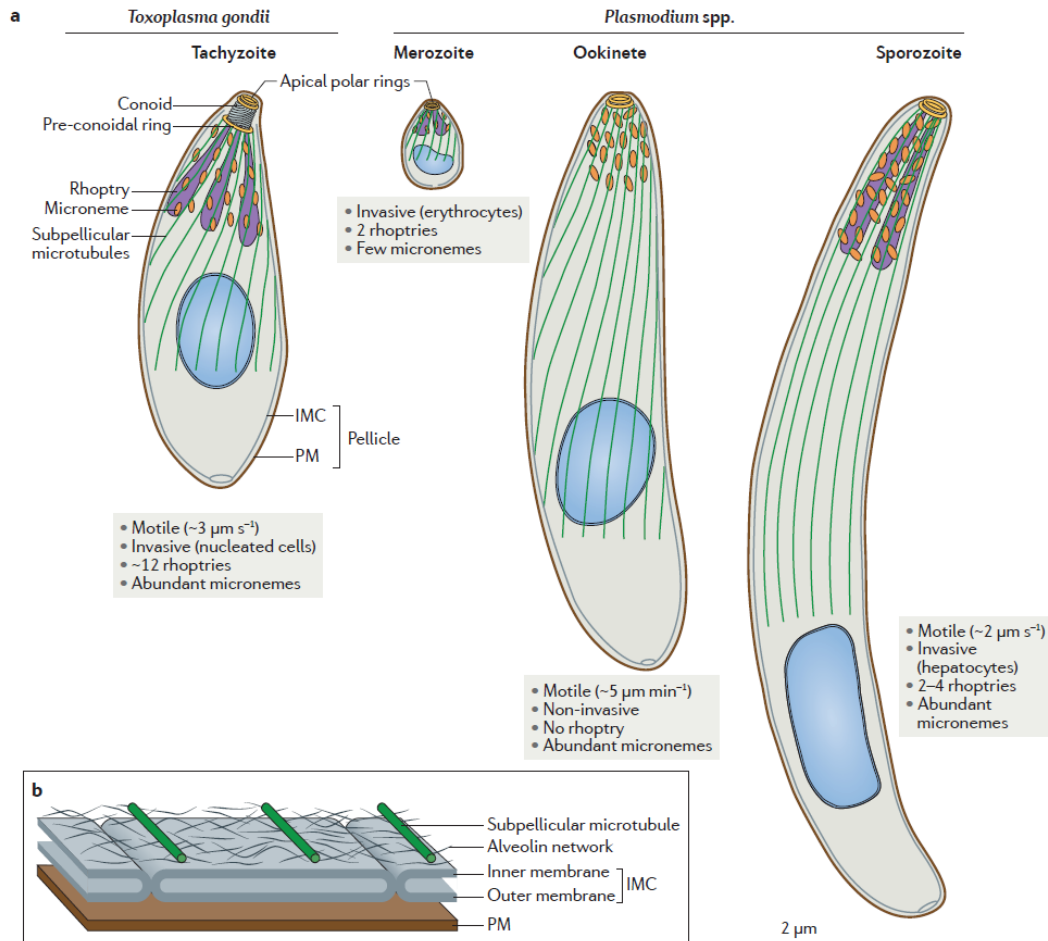
### 1.2.1 Ciclo biológico de la infección natural por *Plasmodium*

El género *Plasmodium* pertenece al filo Apicomplexa, dentro del cual se incluyen también los géneros *Cryptosporidium* y *Toxoplasma*. Los miembros de este filo son organismos unicelulares, eucariotas, patógenos y parásitos intracelulares obligados, caracterizados estructuralmente por la presencia de un complejo apical localizado en su extremo anterior y que está directamente implicado en la invasión a la célula hospedera (Walker DM, et al., 2014).

El complejo apical es un organelo secretor compuesto por la membrana plasmática y la membrana interna que conforman uno o más sacos vesiculares aplanados formados por roptrías, micronemas y anillo polar. Las roptrías corresponden a estructuras alargadas que se unen y forman un conducto rodeado por tres anillos polares y por los micronemas (Figura 1-1). Además, existen filamentos intermedios que forman una red de proteínas denominadas alveolinas, que conectan con la membrana interna. Los microtúbulos sirven como citoesqueleto, mantienen la forma del parásito durante el proceso de motilidad y orientan la trayectoria de invasión celular en el sentido horario. El complejo apical media el proceso de movilidad e invasión del parásito a la célula hospedera. El contenido de los micronemas es liberado al exterior a través de un sistema dependiente de calcio durante el proceso de fusión de las membranas del parásito y la célula hospedera; su motilidad está correlacionada con la abundancia de los micronemas. El contenido de las roptrías también es secretado en el complejo apical y la presencia de proteínas específicas de las roptrías está correlacionada tanto con el proceso de invasión y movimiento del parásito como con el soporte de las fuerzas de tracción generadas durante la penetración en la célula hospedera (Frénal K, et al., 2017).

En la Figura 1-1 se esquematiza la estructura del complejo apical en *Toxoplasma gondii* y *Plasmodium spp.*, con la característica disposición de las roptrías, los micronemas y el anillo polar, además de la disposición de la membrana plasmática y la membrana interna.

**Figura 1-1:** Estructura de los Apicomplexa (Frénal K, et al., 2017).



El ciclo biológico de la infección por *Plasmodium spp.* requiere de un hospedero definitivo donde se lleva a cabo la reproducción sexual del parásito y un hospedero intermediario donde se realiza la reproducción asexual. Para *Plasmodium spp.*, los hospederos definitivos corresponden a las hembras de diversas especies de mosquitos del género *Anopheles*, mientras que los humanos son considerados los hospederos intermediarios (Phillips MA, et al., 2017).

Durante el ciclo biológico, el parásito asume diversas formas encargadas del proceso de invasión celular. En primer lugar, los esporozoítos o formas infectantes, son inoculadas por los mosquitos vectores durante la picadura, migran a lo largo de las células sinusoidales del hígado, ingresan y atraviesan las células de Kupffer y finalmente invaden los hepatocitos; en segundo lugar, los merozoítos invaden los eritrocitos e inician la esquizogonia eritrocítica minutos después de ingresar a la circulación humana (Fréna K, et al., 2017). Las formas haploides pueden ser intra o extra eritrocitarias, esta última en el hígado (fases de esquizogonia eritrocítica y esquizogonia exo-eritrocítica respectivamente). En el hígado, las formas haploides tienen función replicativa. A partir de algunos merozoítos en la circulación periférica del humano se generan gametocitos haploides, que son la forma infectante para el vector (White NJ, et al., 2014).

Como se mencionó anteriormente, la motilidad de las formas parasitarias está correlacionada con la abundancia de los micronemas; los esporozoítos tienen mayor cantidad de micronemas y se deslizan ágilmente por los sinusoides hepáticos, mientras que los merozoítos tienen pocos micronemas y su motilidad es limitada. De igual forma, el ooquinetto que hace parte de la reproducción en el vector, el cual se forma después del cigoto, migra a través del epitelio del intestino medio del mosquito pero no lo invade y da origen al ooquiste (Fréna K, et al., 2017).

### ▪ **Esquizogonia eritrocitaria**

Durante la esquizogonia eritrocitaria se generan las formas parasitarias sanguíneas: trofozoítos jóvenes (o anillos) y maduros, esquizontes jóvenes y maduros y merozoítos (Phillips MA, et al., 2017). Esta fase es cíclica y el proceso de ruptura de los eritrocitos y la liberación de los merozoítos al torrente circulatorio es sincrónico con un tiempo determinado entre 24 y 72 horas, dependiendo de la especie del parásito (Fréna K, et al., 2017). La esquizogonia eritrocitaria está asociada a las manifestaciones clínicas (principalmente la fiebre) en el individuo infectado, además de condiciones patológicas como la anemia secundaria a la ruptura masiva de eritrocitos (Phillips MA, et al., 2017).

La densidad de estas formas parasitarias en sangre periférica también depende de la especie. *P. falciparum* es la especie que puede alcanzar mayor densidad parasitaria debido, entre otros factores, a su capacidad de invadir eritrocitos jóvenes y maduros (White NJ, et al., 2014). Las altas densidades parasitarias están asociadas a mayor probabilidad de casos complicados y mortales (White NJ, et al., 2014). El rango de

parasitemia asexual puede variar entre 100 y  $1 \times 10^{12}$  parásitos/ $\mu$ l de sangre; en general se calcula que la densidad promedio está entre  $1 \times 10^3$  y  $1 \times 10^4$  / $\mu$ l y parasitemias superiores a  $1 \times 10^5$ / $\mu$ l son consideradas un criterio de diagnóstico de malaria complicada (Bousema T, et al., 2014).

### ▪ Gametocitogénesis

Los gametocitos o formas sexuales se originan a partir de algunos merozoítos circulantes en la sangre periférica y requieren de un proceso de maduración que abarca 5 formas diferentes (Bruce MC, et al., 1990). En el caso de *P. vivax* las formas parasitarias asexuales y los gametocitos aparecen simultáneamente en sangre periférica, mientras que en *P. falciparum* los gametocitos aparecen solo 3 semanas después de que las formas asexuales comiencen a ser detectables debido a que en esta especie, los gametocitos inmaduros son secuestrados en la médula ósea en donde llevan a cabo su maduración (Joice R, et al., 2014).

Durante el proceso de secuestro de los gametocitos de *P. falciparum*, los eritrocitos con las formas parasitarias que resultarán en gametocitos se dirigen a la médula ósea y se unen a la pared endotelial de los sinusoides y luego migran al espacio extravascular donde se lleva a cabo la maduración (Silvestrini F, et al., 2012). Otro mecanismo de gametocitogénesis ocurre a partir de esquizontes localizados en el mismo espacio extravascular, que originan merozoítos que maduran a gametocitos siguiendo el mismo proceso, el cual está favorecido por la presencia de islas eritroblásticas en el sistema hematopoyético (Smalley ME, et al., 1981).

Los gametocitos de *P. falciparum* pasan por cinco etapas distintas durante su maduración. La etapa I y la etapa inicial II son morfológicamente similares a los trofozoítos que los originan; sin embargo, durante la etapa tardía II ya es posible distinguir la morfología de los gametocitos. En la etapa III y la etapa IV, las formas parasitarias son más alargadas y en forma de huso, mientras que en la etapa V, los extremos son más redondeados formando una media luna. En la fase final de maduración, los gametocitos salen de la médula ósea a la circulación y se ubican preferentemente en los micro capilares subdérmicos desde donde son accesibles al mosquito durante la ingesta de sangre (Joice R, et al., 2014). Es importante recordar que los gametocitos de cada una de las especies del género *Plasmodium* que infectan a los humanos presentan morfologías microscópicas particulares en su fase final de



maduración que permiten hacer diferenciación de especie y, particularmente para *P. falciparum*, los gametocitos son visibles por microscopía hacia la tercera semana de infección, debido al secuestro en médula ósea de las formas inmaduras; en la infección por *P. vivax*, la parasitemia sexual (gametocitos) y asexual aparece de forma simultánea desde el inicio de la infección (Joice R, et al., 2014).

La densidad de gametocitos maduros en sangre periférica para *P. falciparum* puede ser menor a 100 gametocitos/ $\mu$ l de sangre y frecuentemente no son detectados durante la evaluación microscópica de la sangre (White NJ, et al., 2014). La escasez de gametocitos maduros infectantes y circulantes de *P. falciparum* que puedan ser ingeridos por los vectores representa uno de los cuellos de botella más importantes a nivel del ciclo biológico de esta especie de parásito; por tal razón, los humanos portadores de gametocitos son reservorios de la infección pero solo algunos de estos individuos cumplirán exitosamente el papel de transmisores (Drakeley CJ, et al., 2000). Sin embargo, no existe una relación lineal entre la densidad de gametocitos en sangre periférica y la infectividad en el mosquito (Bousema T, et al., 2012; Churcher TS, et al., 2013).

La producción de gametocitos está asociada con la aparición de manifestaciones clínicas en el humano que producen en el parásito un estado de “estrés” secundario a la respuesta inmune (Bousema JT, et al., 2006). De igual forma, otros factores como el uso de tratamiento antimalárico (Dunyo S, et al., 2006), la anemia (Nacher M, et al., 2002) y condiciones genéticas del humano como las variantes en los tipos de hemoglobinas (Trager W & Gill GS, 1992; Gouagna LC, et al., 2010) son circunstancias que estimulan la inducción y modulación de la gametocitogenesis. Se ha observado que es más frecuente la presencia de gametocitos en individuos con bajas densidades de formas parasitarias asexuales en sangre periférica (Drakeley CJ, et al., 2006) y también se ha visto aumento en las densidades de gametocitos en caso de fallas terapéuticas al tratamiento antimalárico; algunos de estos estudios sugieren que la selección de parásitos resistentes a los medicamentos antimaláricos podría estar asociado con un incremento en la probabilidad de transmisión de este tipo de parásito (Price R, et al., 1999; Barnes KI, et al., 2008). La gametocitogenesis también podría estar influenciada por la temporada seca o lluviosa de transmisión de la malaria en una región determinada (Ouédraogo AL, et al., 2008).

### ▪ **Recombinación genética del parásito en el vector**

Los eventos de recombinación genética de *Plasmodium* ocurren en el vector (Talman AM, et al., 2004). El gametocito macho (microgametocito) sufre exflagelación y divisiones mitóticas, produciendo entre 6 y 8 gametos masculinos móviles que fecundarán al único gameto producido por el gametocito hembra (macrogametocito) (Baton LA, et al., 2005). Con la fecundación se forma el cigoto y ocurren dos procesos meióticos durante los cuales se reordenan y recombinan los 14 cromosomas del parásito (Bennink S, et al., 2016). A partir de cada cigoto se producen 4 potenciales genotipos que son diseminados con los esporozoítos cuando estos emerjan entre 10 y 15 días después de que el vector haya ingerido los gametocitos (Talman AM, et al., 2004). La hembra del género *Anopheles* puede inocular entre 10 y 20 esporozoítos por picadura (White NJ, et al., 2014).

La diversidad genética producto de los eventos recombinatorios le da la posibilidad al parásito de evadir la respuesta inmune del hospedero y desarrollar resistencia a medicamentos antimaláricos y/o vacunas, lo que constituye uno de los obstáculos en los programas para el control y eliminación de la malaria (Phillips MA, et al., 2017). La diversidad genética de los parásitos también genera variabilidad en términos de virulencia, producción de gametocitos, capacidad invasiva y niveles de parasitemia en el humano. La aparición de nuevos genotipos depende, entre otros factores, del nivel de transmisión de la malaria en la zona y de la estructura de la población de *Plasmodium* (Walliker D, et al., 1987; Marques PX, et al., 2005)

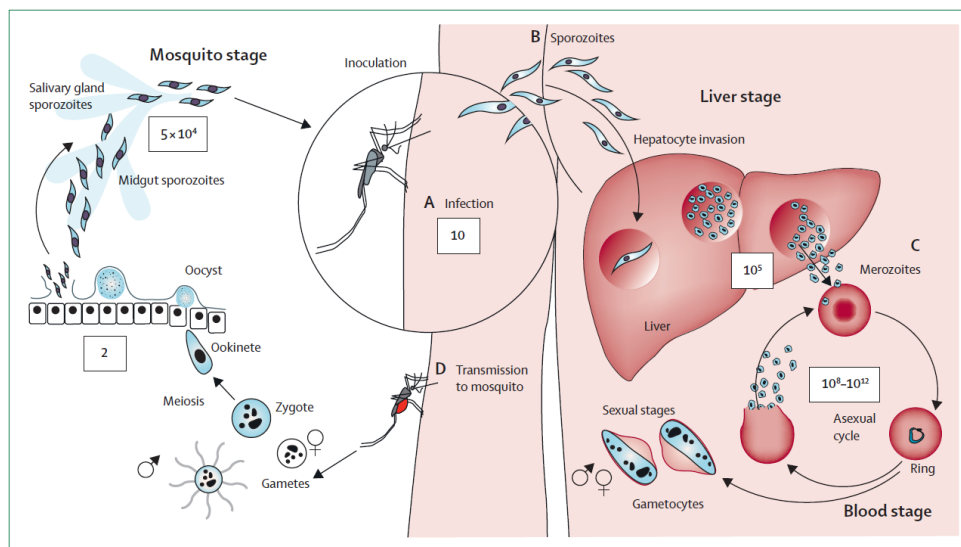
### ▪ **Malaria sintomática y asintomática en el ciclo biológico de la infección natural por *Plasmodium***

En general se considera que la malaria es una enfermedad febril aguda y, como se explicó anteriormente, las densidades parasitarias en sangre tienen una correlación positiva con las manifestaciones clínicas de la infección; es decir, a mayores densidades parasitarias, mayor probabilidad de que la infección sea sintomática (Bousema T, et al., 2014). El tiempo entre la inoculación de los esporozoítos y la aparición de manifestaciones clínicas (tiempo de incubación) está entre 12 y 14 días. Para algunos autores existen los cuadros de malaria crónica, los cuales hacen referencia a aquellos individuos que después de exposiciones repetidas al parásito, desarrollan algún grado de protección frente a la aparición de manifestaciones clínicas; esta parasitemia

asintomática (microscópica o submicroscópica) puede persistir hasta 15 meses (Babiker HA, et al., 1998). Se sabe además que un porcentaje importante de los gametocitos presentes en la circulación del hospedero humano se encuentra de forma submicroscópica y que existe una mayor frecuencia de gametocitos en infecciones asintomáticas y con densidades parasitarias bajas (Bousema T, et al., 2014), lo cual es crucial en el mantenimiento natural de la infección.

En la Figura 1-2 se observan las diferentes fases del ciclo biológico de *Plasmodium* en humanos, además de las formas parasitarias presentes en cada uno de los hospederos. En las diferentes fases del ciclo biológico de *P. falciparum* ocurren momentos de expansión y reducción en el número de formas parasitarias, este último considerado como cuellos de botella biológicos en el ciclo (Meibalan E, et al., 2017). Durante la inoculación, la hembra del género *Anopheles*, inyecta los esporozoítos; se calcula que si se inicia con unos 10 esporozoítos, luego de la fase hepática del ciclo se transformarán en  $1 \times 10^5$  merozoítos, número que se amplificará entre  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^{12}$  durante la esquizogonia eritrocitaria (en un individuo susceptible, la población de parásitos se expande entre 6 y 20 veces por ciclo), pero finalmente sólo 100 gametocitos/ $\mu$ l de sangre estarán circulando en los capilares para ser ingeridos por el vector. Luego de la fecundación en el vector, de dos ooquistes emergerán  $5 \times 10^4$  esporozoítos que se almacenarán en las glándulas salivares del mosquito (White NJ, et al., 2014).

**Figura 1-2:** Ciclo biológico de la infección por *Plasmodium* en humanos (White NJ, et al., 2014).



### **1.2.2 Estructura genética de la población de *Plasmodium* y marcadores genéticos de la resistencia a los antimaláricos**

La estructura genética de una población está determinada por la desviación de la hipótesis que plantea que las poblaciones del parásito se reproducen entre ellas al azar y las frecuencias alélicas permanecen iguales de generación en generación, es decir, están en Equilibrio de Hardy-Weinberg. La desviación de esta hipótesis se manifiesta en estructuras poblacionales parasitarias con frecuencias alélicas diferentes. La variabilidad genética de una población específica está determinada por el número y la frecuencia de los distintos alelos del conjunto de genes al interior de la población. El genoma de *Plasmodium* consta de 14 cromosomas lineales, con un tamaño aproximado de 22 mega bases y algo más de 5000 genes que codifican proteínas, entre ellos algunos pertenecientes a las familias de genes asociados a variaciones génicas importantes (Kirchner S, et al., 2016). La variabilidad genética de *P. falciparum* depende de su ubicación geográfica, del nivel de endemidad de la malaria y de la estacionalidad de la misma (Chenet SM, et al., 2012).

Por otro lado, el principio de Hardy-Weinberg establece que la composición genética de una población permanece en equilibrio mientras no actúen factores como la selección natural, la migración y las mutaciones. Un factor que puede afectar las frecuencias de los genotipos es la herencia de genes ligados. El ligamiento se define como la asociación de genes o secuencias de ADN vecinas y ubicadas en el mismo cromosoma en las que aumenta la posibilidad de ser heredados conjuntamente por causa de su proximidad. De esta forma, el desequilibrio de ligamiento es la propiedad de algunos genes en una población de no segregarse de forma independiente (frecuencia de recombinación menor al 50%). En estos casos, los dos loci implicados se encuentran en el mismo cromosoma y no son transferidos de manera aleatoria a la progenie (de Meeûs T, et al., 2007).

Estudios sobre la estructura genética de las poblaciones de *P. falciparum* han reportado que en zonas de baja transmisión como Suramérica y el Sureste asiático existe un desequilibrio de ligamiento importante, una diversidad genética baja y niveles altos de diferenciación geográfica (Anderson T, et al., 2000 ; Griffing S, et al., 2011; Farooq U, et al., 2012; Ohrt C, et al., 1997) en comparación con zonas de alta transmisión en África, en las cuales se ha descrito diversidad genética alta y niveles de diferenciación

geográfica bajos (Bogreau H, et al., 2006; Leclerc MC, et al., 2002; Durand P, et al., 2003).

Las infecciones múltiples, que ocurren cuando diferentes cepas o variantes alélicas del parásito pueden ser identificadas en un humano infectado, son un reflejo de la diversidad genética y de la estructura de la población del parásito. Por ejemplo, las infecciones por *P. falciparum* pueden ser monoclonales (una sola cepa o variante antigénica) o policlonales (más de una cepa o variante antigénica) dependiendo del nivel de transmisión de malaria en la región. En las zonas de baja transmisión, como en la Región de las Américas, es más frecuente que los casos de malaria estén asociados a un único clon, siendo menos probables los eventos de recombinación en el vector. En las zonas de alta transmisión se espera que las infecciones sean policlonales y, por consiguiente, exista una mayor diversidad genética como consecuencia de la mayor probabilidad de entrecruzamiento de gametos diferentes (Anderson TJ, et al., 2000). Es decir, si la población de parásitos es altamente diversa, como sucede en zonas de alta transmisión, la recombinación va producir nuevos genotipos, pero si la diversidad es baja, como sucede en zonas de baja transmisión, la recombinación no va producir mayores cambios en los genotipos. Las infecciones múltiples pueden ser más duraderas y generar competencia entre genotipos infectantes; la infección por un solo genotipo puede durar hasta 200 días y durante la mayor parte del tiempo serán infecciones submicroscópicas (Tanner M, et al., 1999; Bousema T, et al., 2014).

La evidencia genética sugiere un origen múltiple de *P. falciparum* en la Región de las Américas, que probablemente se remonta al tráfico de esclavos africanos entre los siglos XVI y XIX, y que generó un cuello de botella cuyo efecto ha sido la disminución de la diversidad genética en las poblaciones americanas de esta especie del parásito (Anderson TJ, et al., 2000; Yalcindag E, et al., 2012).

Por otra parte, la historia de selección por el uso de antimaláricos, que ha disminuido progresivamente las prevalencias de infección en la Región de las Américas, también ha contribuido a la reducción de la diversidad genética de *P. falciparum*. Las cepas de *P. falciparum* resistentes a los antimaláricos se originaron en zonas de baja transmisión tales como Suramérica y el Sureste asiático. La teoría que mejor explica el surgimiento de las cepas resistentes hace referencia a la presión de selección ejercida por los medicamentos antimaláricos y la posterior transmisión de cepas con mutaciones espontáneas que conllevan menor susceptibilidad al medicamento (Barnes KI & White NJ, 2005). Una vez que la resistencia emerge, su diseminación se hace a través de los

gametocitos pertenecientes a estas cepas de susceptibilidad limitada (Barnes KI, Little F, Mabuza A, Mngomezulu N, et al., 2008).

En zonas de alta transmisión, en las cuales las infecciones múltiples son más frecuentes, los procesos recombinatorios generan competencia entre los diferentes genotipos del parásito y, posiblemente, le dan mayor oportunidad de sobrevivir a las cepas con alelos resistentes. En zonas de baja transmisión, en las cuales las infecciones son monoclonales, los genotipos con alelos resistentes tienden a fijarse más fácilmente en la población de parásitos. Además, en las regiones de baja transmisión la respuesta inmune de los humanos infectados no es suficiente para eliminar la masa parasitaria en sangre y, por lo tanto, es más frecuente que existan individuos asintomáticos a los que no se les suministra el tratamiento adecuado o que reciben dosis subterapéuticas de los antimaláricos; de esta forma, se favorece la aparición de cepas resistentes (Takala-Harrison S & Laufer MK, 2015).

Las tasas de mutación en *Plasmodium* están directamente relacionadas con la ocurrencia de la resistencia a los antimaláricos. En el caso de la resistencia a sulfadoxina-pirimetamina, *P. falciparum* requiere de la acumulación progresiva de mutaciones en los codones S108N e I164L del gen *dhfr*, las cuales generan fuerte resistencia a la pirimetamina, y mutaciones en los codones N51I y C59R del mismo gen, que son los moduladores de esta resistencia (Gregson A & Plowe CV, 2005; Hyde JE, et al., 2008). Además, las mutaciones en los codones A437G y A581G del gen *dhps* generan resistencia a la sulfadoxina y mutaciones subsecuentes en los codones S436A, K540E y A613S modulan este mecanismo de resistencia (Gregson A & Plowe CV, 2005). Por otra parte, mutaciones en los genes *pfcr1* y *pfmdr1* están asociadas con la reducción de la susceptibilidad a la cloroquina (Valderramos SG & Fidock DA, 2006; Gabryszewski SJ, et al., 2016). Por último, se han identificado mutaciones en el dominio *kelch* de *P. falciparum* como posibles marcadores genéticos de resistencia a los derivados de artemisinina (ACT), compuestos usados actualmente en terapias combinadas como tratamiento de primera línea para la malaria no complicada por *P. falciparum* bajo el supuesto de que el uso combinado de medicamentos de vida media corta (como los derivados de artemisinina) y vida media larga retrasa el surgimiento de resistencia; sin embargo, se han reportado casos de resistencia surgidos de forma independiente en múltiples lugares en el Gran Mekong en el Sur Este Asiático (Ariey F, et al., 2013).

### 1.2.3 Análisis del polimorfismo de nucleótido único (SNPs) y microsatélites en la descripción de la estructura genética de *P. falciparum*

Existen diferentes cepas de *P. falciparum* que han sido caracterizadas por su asociación a manifestaciones clínicas (Garnham P, 1966) según sus perfiles isoenzimáticos (Fenton B, et al., 1985) o su estructura molecular, lo cual ha sido posible gracias al desarrollo de técnicas que permiten identificar polimorfismos de nucleótido único (SNPs) y al análisis de la variación de secuencias repetidas conocidas como microsatélites (Auburn S & Barry AE, 2017). En las investigaciones sobre la transmisión de la malaria, la genotipificación de regiones altamente polimórficas como los microsatélites y los análisis de polimorfismo de nucleótido único (SNPs) son técnicas relativamente recientes, que han sido usadas para identificar infecciones múltiples y determinar la diversidad genética y la estructura de las poblaciones de los parásitos.

#### ▪ Microsatélites

Los primeros marcadores de microsatélites utilizados para caracterizar los parásitos causantes de la infección por malaria fueron determinados en 1999 (Anderson TJ, et al., 1999). Se considera que las modificaciones en los alelos microsatelitales asociados a genes de resistencia presentes en varias muestras tienen un mismo origen, dada la baja probabilidad de que esto ocurra de forma independiente en las poblaciones del parásito en una misma área geográfica. Mediante este tipo de análisis, se estudió el flujo genético en zonas de baja transmisión en América y se estableció que el origen de la infección de *P. vivax* en la región se localiza en Iquitos, Perú, debido a las altas tasas de desequilibrio de ligamiento detectadas en la localidad (Delgado-Ratto C, et al., 2016).

En zonas de alta transmisión es frecuente la presencia de múltiples clones del parásito; particularmente en el caso de *P. falciparum*, las poblaciones tienden a ser panmíticas (poblaciones con entrecruzamiento debido básicamente al azar), presentan bajas tasas de desequilibrio de ligamiento (equilibrio de ligamiento) y alta diversidad genética. En el caso de zonas de baja transmisión hay pocos clones del parásito en circulación y, para *P. falciparum*, las poblaciones se caracterizan por la baja diversidad genética y las altas tasas de desequilibrio de ligamiento, lo cual es coherente con el poco flujo genético dentro y entre las poblaciones del parásito en zonas de baja transmisión (Auburn S & Barry AE, 2016).

### ▪ **Análisis de polimorfismo de nucleótido único (SNPs)**

El análisis del polimorfismo de nucleótido único (SNPs) es una técnica complementaria y alternativa a la de los microsatélites, dadas las dificultades para establecer un modelo de la variabilidad y por la dificultad para estandarizar las metodologías en las plataformas de genotipificación y análisis de la información en el caso de loci microsatelitales (Sutton PL, et al., 2013). El análisis de SNPs permite describir patrones de transmisión de malaria en una zona determinada a través de un conjunto de sitios polimórficos que operan como un código de barras que permite etiquetar la variabilidad genética en individuos o poblaciones parasitarias. Este código de barras permite establecer parámetros tales como la multiplicidad de infección y la diversidad de haplotipos. La técnica es útil para describir la estructura de población del parásito y monitorearla en el tiempo, sobre todo si se desea evaluar algún tipo de intervención. Los SNPs no solo han sido útiles para definir patrones de transmisión de *P. falciparum* por ejemplo en Senegal, Zambia, Panamá y Etiopía (Auburn S & Barry AE, 2017), sino que también se han utilizado para determinar el origen de *P. vivax* (Baniecki ML, et al., 2015). Aunque el análisis de SNPs puede ser más práctico, rápido y barato que el de microsatélites, con esta técnica también se tienen dificultades para definir cambios en los patrones de transmisión y la estructura de población del parásito a nivel local, en resoluciones más finas (Auburn S & Barry AE, 2017).

### ▪ **Proyecto SpotMalaria**

Desde el año 2015 en el Wellcome Sanger Institute se ha desarrollado el proyecto SpotMalaria que a través de tecnologías genómicas permite monitorear la evolución genética de los parásitos a nivel mundial, contribuyendo de esta forma con los esfuerzos de eliminación y erradicación (<https://www.malariagen.net/projects/spotmalaria>). Este proyecto consta de una amplia red de colaboradores a nivel mundial que, de forma conjunta, ofrece datos sobre la genética del parásito. De esta forma, se encuentra disponible desde el año 2015 la información relacionada con más de 900000 SNPs en regiones exónicas del genoma, obtenidos a partir del análisis de 3488 muestras recolectadas en papel de filtro provenientes de 43 localidades en 23 países. Las muestras son secuenciadas con la colaboración del Wellcome Sanger Institute y la mayoría de los datos se encuentran disponibles en las bases del European Nucleotide Archive (<http://www.ebi.ac.uk/ena/home>).



En el caso particular de *P. falciparum*, los datos del proyecto ofrecen información sobre más de 20 variaciones genéticas relacionadas con genes asociados a la resistencia a los antimaláricos:

- Mutaciones en el dominio propeller (gen *kelch13*): resistencia a artemisinina.
- Mutaciones en *pfexo*: resistencia a piperaquina.
- Mutaciones en *pfcr1* y *pfmdr1*: resistencia a cloroquina, amodiaquina y mefloquina.
- Mutaciones en *pfdhps* y *pfdhfr*: resistencia a antifolatos.
- Mutaciones en *arps10*, *mdr2*, *fd* y *crt326*: relacionados con antecedentes genéticos del parásito para la mutación en *kelch13* (Parasite genetic background o PGB).

A manera de conclusión, en la Tabla 1-3 se resume el comportamiento de los parámetros poblacionales e inmunológicos descritos en zonas de alta y baja transmisión para *P. falciparum*.

**Tabla 1-3:** Diferencias entre zonas de alta y baja transmisión en cuanto a la intensidad de transmisión, la estructura de la población de *P. falciparum*, la respuesta inmune y la malaria.

	Zonas de alta transmisión	Zonas de baja transmisión
Nivel de parasitemia	Alto	Bajo
Especie parasitaria más frecuente	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>
Diversidad genética de <i>P. falciparum</i> (variabilidad alélica)	Alta	Baja
Proporción de infecciones múltiples de <i>P. falciparum</i>	Alta (policlonal)	Baja (oligoclonal o monoclonal)
Inmunidad adquirida	Niños mayores y adultos	Independiente de la edad
Títulos de anticuerpos	Altos	Resultados no concluyentes
Proporción de malaria asintomática	Baja	Alta

Fuente: Construcción propia.

## 1.3 Dinámica de transmisión de la malaria

### 1.3.1 Intensidad de la transmisión y otras definiciones en malaria

La malaria es considerada la primera causa de enfermedad parasitaria a nivel mundial y anualmente, se invierten miles de millones de dólares en programas para su eliminación; sin embargo, la transmisión de la malaria está relacionada con las pobres condiciones sociales y económicas de las poblaciones que la padecen, la inequidad y falta de acceso a servicios esenciales de atención y la falta de cobertura universal de las intervenciones contra la enfermedad (WHO, 2014). Para estudiar y clasificar el comportamiento epidemiológico de la malaria en las regiones endémicas, se han definido una serie de indicadores específicos que se describen a continuación.

*Intensidad de transmisión de la malaria (ITM) y tasa de inoculación entomológica (TIE):* La ITM es la frecuencia con la cual los mosquitos vectores infectados inoculan las formas infectantes de *Plasmodium* en los humanos y se expresa en función de la *Tasa de Inoculación Entomológica (TIE)*, que es un indicador de la carga por malaria en una población humana específica en un momento determinado. La TIE se define como el número de picaduras infecciosas por individuo por unidad de tiempo. Entre los factores de mayor importancia para la determinación de la intensidad de la transmisión se cuentan los parámetros entomológicos como longevidad, hábitos de picadura y eficiencia de transmisión del parásito y las variables epidemiológicas que relacionan las densidades poblacionales de vectores y humanos. De este modo, las áreas de alta intensidad de transmisión se definen como las zonas en las cuales un individuo puede recibir más de 1000 picaduras infecciosas por año, mientras que en las áreas de baja transmisión el número de picaduras infecciosas por individuo puede ser igual o menor que uno. Una tasa alta de inoculación entomológica es un factor importante en la generación de mayor diversidad genética en las poblaciones de *Plasmodium* y favorece la aparición de infecciones múltiples. Las mayores TIE (alta transmisión) se encuentran en África tropical y las menores (baja transmisión) en Cáucaso, Asia Central y América (Smith TA, et al., 2017).

*Capacidad vectorial:* es una medida útil para evidenciar el potencial vectorial de una especie. Este índice determina el número de contactos potencialmente infectantes que un humano tiene con una población de vectores que ha superado el periodo de latencia

del parásito, en una unidad de tiempo. Este indicador depende tanto de factores relacionados con la biología del vector (esperanza de vida y probabilidad de supervivencia) como de su relación con los parásitos (duración del ciclo esporogónico en el vector y proporción de especies vectoras que sobreviven un ciclo esporogónico) y con las poblaciones humanas (relación entre las densidades poblacionales de vectores y humanos y frecuencia de picaduras del vector al humano o antropofilia). Al igual que sucede con la TIE, la obtención de esta tasa requiere de la realización de estudios costosos y prolongados, además del traslado de muestras de anofelinos al laboratorio, lo que dificulta el cálculo del indicador en zonas de bajas densidades vectoriales, como ocurre en América. En África, en donde las densidades de vectores son altas y existe un patrón antropofílico marcado, la capacidad vectorial se emplea como predictor en alertas tempranas de epidemias (Castro MC, 2017).

*Fuerza de infección y fuerza de infección molecular:* la fuerza de infección es el número de infecciones (sintomáticas o asintomáticas) por persona durante un tiempo determinado, generalmente un año. Es un buen indicador de heterogeneidad de la exposición y de nivel de la exposición de la infección; sin embargo, su precisión para describir la dinámica es mayor en zonas de baja transmisión, ya que en regiones en donde la TIE es superior a 10, su uso tiende a no ser concluyente. Con el fin de determinar si las infecciones son realmente recientes, se utiliza la *fuerza de infección molecular*, que es el número de nuevos parásitos o clones del parásito adquiridos por unidad de tiempo. Los modelos catalíticos a través de las encuestas de corte transversal o los estudios de cohorte son metodologías para determinar este indicador, lo que requiere estudios amplios con representatividad para todos los grupos de edad. El uso de técnicas de diagnóstico molecular mejora de forma importante el nivel de detección de las infecciones, pero factores como la estacionalidad de la infección pueden hacer que algunos clones del parásito sean indetectables, incluso por PCR, en algunos momentos del año. Hay otros factores que pueden afectar los resultados, como la edad, el uso de toldillos impregnados con insecticidas o el uso de quimioterapia (Tusting LS, et al., 2014).

*Índice parasitario anual (IPA):* es una tasa expresada en 1000, que relaciona el número de casos de malaria ocurridos en un año sobre la población en riesgo, en una zona determinada. Este índice permite clasificar las regiones en zonas de transmisión alta (IPA>10), moderada (IPA 1-10) y baja (IPA<1) (OMS, 2017(a)).

A partir de la combinación de los parámetros descritos anteriormente se determina que las zonas de transmisión estacional inestable de la malaria presentan valores de TIE por

debajo de 10 (promedio entre 1 y 2) e IPA entre 1 y 10 (con mayor frecuencia los valores son menores que 1); estas zonas se localizan en gran parte de Asia y América. Por otra parte, las zonas de transmisión estacional estable de malaria se caracterizan por presentar valores de TIE entre 10 y 100 e IPA mayores que 10; estas regiones se localizan principalmente en África Occidental (Moss WJ, et al., 2015). En zonas de baja transmisión pueden existir pequeñas áreas geográficas en las que sus habitantes tengan probabilidades mayores de exposición a la picadura de los vectores, haciendo que la distribución de los casos no sea uniforme. Estas áreas son conocidas como “puntos críticos” o “puntos calientes” y son blancos de intervención (Sturrock HJ, et al., 2013; Mosha JF, et al., 2013).

*Número reproductivo básico (Ro)*: las variables entomológicas y las epidemiológicas humanas de transmisión de la infección pueden resumirse en un concepto cuantificable denominado *número reproductivo básico (Ro)*, que es el número de picaduras infecciosas secundarias generadas a partir de un individuo en una población susceptible. Si el Ro es superior a 1, la infección tiende a la expansión mientras que si el Ro es menor que 1 la infección tiende a la desaparecer (Smith TA, et al., 2017).

La ecuación del número Ro se expresa como  $Ro = \frac{ma^2 bc p^\tau}{-\gamma \log(p)}$ , donde:

$m$  = número de mosquitos hembras por hospedero humano

$a$  = número de picaduras por mosquito por día

$b$  = probabilidad de transmitir la infección de un mosquito infeccioso a un ser humano (por picadura)

$c$  = probabilidad de transmisión de infección de un humano infeccioso a un mosquito (por picadura)

$\gamma$  = índice de recuperación de humanos de la infecciosidad ( $1/\gamma$  = duración de la infecciosidad humana)

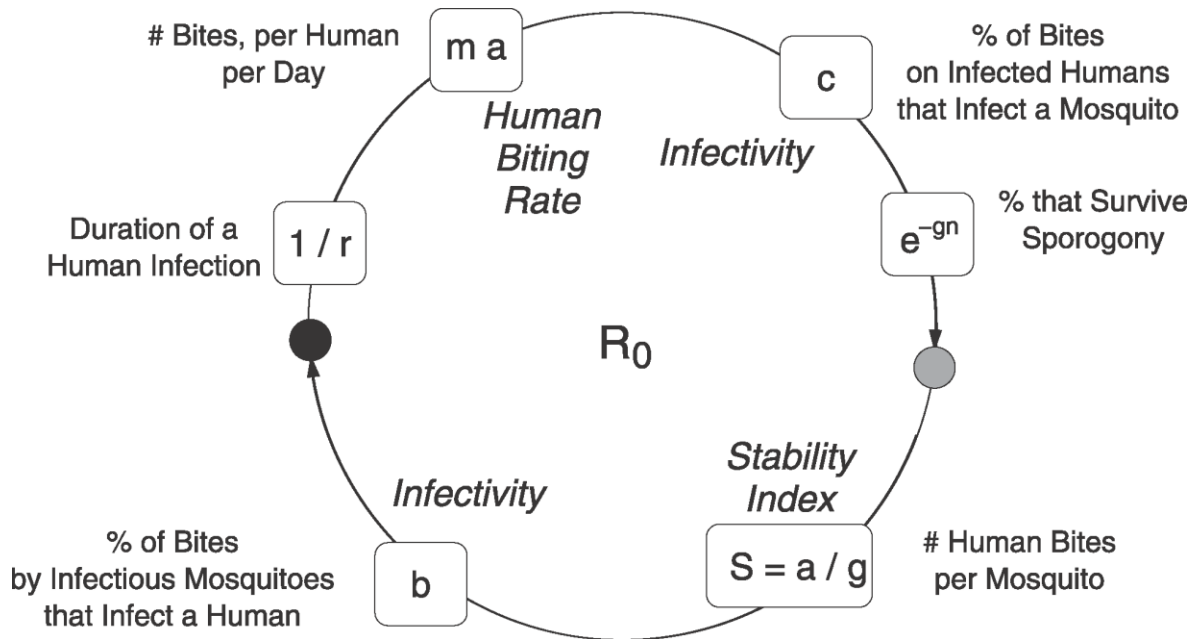
$p$  = supervivencia diaria de los mosquitos adultos

$\tau$  = el período requerido para el desarrollo de esporozoítos durante la infección en el mosquito

En la Figura 1-3 se grafica el fenómeno dinámico reflejado por el número  $R_0$ , utilizando los parámetros explicados anteriormente. Así, se obtiene el número esperado de hospederos humanos o mosquitos que se infectarían luego de una generación completa

del parásito a partir de un solo vector o un solo humano infectado, concibiendo de forma dinámica la interrelación de los parámetros del humano y del vector. Usando la ecuación, es posible comparar el impacto de la intervención en diferentes etapas del ciclo de la malaria. De esta manera se muestra que al disminuir la población de hembras del mosquito adultas se logra una mayor reducción en la transmisión mucho más que al intervenir en cualquier otra etapa del ciclo de vida del parásito o del vector, suponiendo que todos los otros factores sean estables. El número  $R_0$  sirve, por tanto, para describir la dinámica de la infección y como instrumento para evaluar la eficiencia de los mecanismos de control (Smith TA, et al., 2017).

**Figura 1-3.** El número  $R_0$  y la relación dinámica de los parámetros humanos y del vector. Fuente: Smith DL, et al., 2007.



## 1.4 Historia del control y la eliminación de la malaria

La Campaña Mundial para la Erradicación de la Malaria operó entre 1955 y 1969 y sus principales estrategias fueron el rociado intradomiciliario y extra domiciliario con dicloro difenil tricloroetano (DDT), el uso de larvicidas y la administración masiva de antimaláricos como la cloroquina. Esta campaña se inició en 1955 durante la octava Asamblea Mundial de la Salud en México D.F. y finalizó en 1969 durante la 22a Asamblea Mundial de la Salud en Boston. Aunque esta campaña aseguró la eliminación de la malaria en varias regiones del mundo como Europa Occidental y los Estados Unidos de América, terminó abandonándose debido a obstáculos técnicos como el surgimiento de especies del vector resistentes al DDT y de parásitos resistentes a los antimaláricos (los primeros casos de resistencia a cloroquina se informaron en 1958), además de la falta de apoyo político y financiero en muchos países durante esa época. De igual forma, no se tuvieron en cuenta las diferencias epidemiológicas locales ni regionales y los países no contaban con la experiencia administrativa ni epidemiológica para asumir las estrategias planteadas (WHO, 2016).

Durante las décadas de los años 70, 80 y 90 se desarrollaron estrategias encaminadas al control de la malaria, pero con un claro deterioro en la morbilidad y mortalidad en malaria a nivel mundial. A pesar de las recomendaciones surgidas de la Primera Conferencia en Atención Primaria de Salud en Alma-Ata en 1978, los gobiernos no abandonaron las prácticas de erradicación y no asumieron el nuevo enfoque de la atención primaria. Aparecieron, además, nuevos factores de riesgo como el cambio climático, conflictos armados y sobre la tenencia de tierras y crisis económicas en diferentes regiones del mundo que movilizaron la población humana y la expusieron a la picadura del mosquito. Además, surgió la resistencia a nuevos antimaláricos y se diseminó la resistencia a la cloroquina a nivel mundial (Alger J, 1998), aunque es importante aclarar que tanto *P. vivax* como *P. falciparum* se mantienen susceptibles a la cloroquina en la subregión de Mesoamérica y la isla de La Española en la actualidad (COMISCA, 2015).

Ante el panorama descrito para los años 70, 80 y 90, surgió la Estrategia Mundial de Lucha contra el Paludismo durante la Conferencia Ministerial sobre Malaria en Ámsterdam en 1992. Esta estrategia se basaba en componentes técnicos que aseguraban el diagnóstico y tratamiento oportunos, implementaban actividades de control vectorial sostenibles y selectivas, detectaban, contenían y prevenían las epidemias y fortalecían la investigación básica y aplicada, principalmente a nivel local y de tal forma

que se evaluara de forma regular la situación en malaria, incluyendo factores ecológicos y socio-económicos locales. Esta estrategia tuvo como objetivos disminuir la morbilidad por malaria y prevenir la mortalidad asociada a ella a través de la aplicación de medidas de control. Durante su ejecución se puso en evidencia la variabilidad en los contextos epidemiológico, ecológico, social y operacional entre países y entre regiones en cada país. Con esta estrategia se concluyó que se requería de un análisis de costo-efectividad para asegurar medidas sostenibles, además de la participación de otros sectores como medioambiente, educación, agricultura, desarrollo y planeación, siendo fundamental la descentralización administrativa y la participación comunitaria en la toma de decisiones (OMS, 2017(b)).

A finales de los años 90, la Estrategia Mundial de Lucha contra el Paludismo fue acompañada por iniciativas como la de “Hacer Retroceder el Paludismo” (HRP, del inglés Roll Back Malaria). Esta iniciativa surgió luego del análisis realizado por la OMS, en el cual se aseguraba que el control de la malaria en aquella época era inadecuado debido, entre otras razones, a la incapacidad de los países endémicos para responder a las necesidades de enfrentar esta enfermedad, a la falta de fondos, a la ausencia de esfuerzos internacionales coordinados y a la alta frecuencia de sistemas de salud debilitados. En este contexto, se conjugaron los esfuerzos de los países con riesgo de transmisión, las agendas bilaterales de desarrollo y de las Naciones Unidas, los bancos de desarrollo, el sector privado y organizaciones no gubernamentales para la creación de esta iniciativa. El objetivo final era la disminución significativa de la carga de morbilidad por malaria, básicamente asegurando el acceso de la población más pobre a intervenciones antimaláricas eficaces (Remme JH, et al., 2001). Su región objetivo inicial fue África, pero posteriormente la iniciativa se generalizó y fue apoyada por estrategias regionales como la Red Amazónica de Vigilancia de la Resistencia a los Antimaláricos (RAVREDA), que originalmente fue conformada en 2001, en colaboración con la OPS, por Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Guyana, Perú, Surinam y Venezuela como una respuesta al reto de la resistencia a los antimaláricos en la región amazónica; posteriormente, se involucraron países de Centroamérica y el Caribe. De forma paralela y también como apoyo de la iniciativa HRP en América Latina, la Agencia de Desarrollo Internacional de los Estados Unidos y la Oficina de Enfermedades Infecciosas en América Latina y el Caribe (USAID/LAC) lanzaron la Iniciativa contra la Malaria en la Amazonía (Amazon Malaria Initiative/AMI) en 2001 (Recht J, et al., 2017).

A comienzos del siglo XXI ya estaba establecido que el uso de toldillos impregnados con insecticidas de larga duración (TILD), la aplicación de pruebas rápidas para el diagnóstico y la administración de terapia combinada con derivados de artemisinina eran estrategias prometedoras, eficaces y basadas en evidencias que funcionaban en el control de la malaria, así que para el año 2007 se estaba retomando la idea de la eliminación de la malaria, con el apoyo financiero del Fondo Mundial de Lucha contra el Sida, la Tuberculosis y la Malaria y la Fundación Bill y Melinda Gates (Meibalan E & Marti M, 2017).

Con la implementación de estas herramientas antipalúdicas y en el marco de la declaración de los Objetivos de Desarrollo del Milenio, en el año 2015 se logró alcanzar la meta 6C del objetivo 6, la cual consistía en detener y empezar a revertir la incidencia mundial de la malaria entre 2000 y 2015; durante este periodo se redujo la morbilidad por malaria en 41% y la mortalidad en 62%. De igual forma, con las actividades del Plan Estratégico Regional contra la Malaria en las Américas 2006-2010 se redujo en 52% la morbilidad por la malaria en la región entre el año 2000 y el 2009, y disminuyeron en un 69% las muertes relacionadas con esta enfermedad y se alcanzaron las metas de reducción de la carga de malaria en 18 de los 21 países endémicos de la región (OMS, 2017(b); OMS. OPS, 2011).

Con este panorama, en el año 2015 se lanzó la Estrategia Técnica Mundial de la OMS contra la Malaria 2016-2030. Los pilares de la estrategia son los de garantizar el acceso universal a la prevención, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad, acelerar los esfuerzos dirigidos a la eliminación y a la obtención del estado de «libre de paludismo» y convertir la vigilancia del paludismo en una intervención básica. Para alcanzar estos tres pilares se necesitan dos elementos claves que son el aprovechamiento de las innovaciones junto con la expansión de la investigación y desarrollo y el fortalecimiento de un entorno propicio mediante la financiación, el compromiso político y la colaboración multisectorial (OMS, 2016).

Las metas de la Estrategia Técnica Mundial para 2030 son la reducción de la incidencia de casos de malaria y de sus tasas de mortalidad como mínimo en un 90%, la eliminación de la enfermedad en 35 países más en comparación con la situación existente en el 2015 y la prevención del restablecimiento de la enfermedad en países



libres de ella. Además de estas metas, existen también hitos intermedios para 2020 y 2025 (OMS, 2016) (Tabla 1-4).

**Tabla 1-4:** Objetivos, hitos y metas de la Estrategia Técnica Mundial contra la Malaria, 2016-2030.

Objetivos	Hitos		Metas
	2020	2025	2030
1. Reducir las tasas de mortalidad por malaria en todo el mundo en comparación con las de 2015	Por lo menos 40%	Por lo menos 75%	Por lo menos 90%
2. Reducir la incidencia de casos de malaria en todo el mundo en comparación con la de 2015	Por lo menos 40%	Por lo menos 75%	Por lo menos 90%
3. Eliminar la malaria en los países que siga habiendo transmisión en 2015	Por lo menos 10 países	Por lo menos 20 países	Por lo menos 35 países
4. Evitar el restablecimiento de la malaria en todos los países exentos de la enfermedad	Reestablecimiento evitado	Reestablecimiento evitado	Reestablecimiento evitado

Fuente: (OMS, 2016).

En Colombia, la lucha antimalárica ha recorrido el camino de la erradicación, el control y la eliminación. El Servicio de Erradicación de la Malaria (SEM) fue un programa que funcionó desde 1958 hasta 1984. Entre 1957 y 1959 se desarrolló la fase preoperatoria y en los años sesenta se inició la fase operatoria. Al igual que en las campañas de erradicación mundial, las estrategias de erradicación en Colombia fueron el uso del DDT y la administración masiva de cloroquina. Una de las herramientas de soporte para las campañas de erradicación fue el registro detallado y sistemático de la información epidemiológica (consumo de insumos y medicamentos, número de láminas leídas, número de personas examinadas, número de visitas a cada región, entre otras) y el diseño de mapas manuales elaborados por los funcionarios que se adentraban en las zonas lejanas y rurales que visitaban, con lo que se logró una cobertura amplia de las zonas maláricas en el país (Carmona-Fonseca J, 2003; Franco S, 1990; Valero-Bernal

MV, 2006). Sin embargo, parte de las razones del fracaso del SEM fue la crisis financiera y el hecho de que fue una estrategia a la que le faltó tomar en cuenta la realidad social y cultural de los pobladores (Franco S, 1990). En 1984, la OMS cambió los planes de erradicación de la malaria por una estrategia del control; en Colombia, las funciones del SEM fueron asumidas por las direcciones o secretarías departamentales de salud. Con la Ley 100 de 1993, el Sistema de Salud colombiano sufrió un cambio drástico que llevó a que los programas centralizados y verticales, como el del control de la malaria, se desarticularan y casi desaparecieran. Durante esa época, las funciones del programa de control de la malaria pasaron a ser responsabilidad de los municipios y los departamentos (Borrero E, et al., 2012).

Actualmente, los objetivos de la Estrategia de Gestión Integrada (EGI) para la promoción, prevención y control de las Enfermedades Transmitidas por Vectores en Colombia 2012 – 2021 y el Plan Decenal de Salud Pública en Colombia son los de reducir en un 80%, de manera progresiva y sostenida, la mortalidad por malaria en todas las entidades territoriales durante el periodo 2012-2021, reducir progresivamente en un 50%, la morbilidad por malaria en las áreas endémicas del país hasta el año 2021 y, para el mismo año, eliminar la transmisión periurbana de malaria en los 16 focos identificados en Colombia, trece de los cuales están ubicados en la Región Pacífica (Ministerio de Salud y Protección Social, 2013; Ministerio de Salud y Protección Social y OPS, 2014).

La EGI está conformada por siete componentes: la gerencia del programa, relacionada con la planeación monitoreo y evaluación; la inteligencia epidemiológica, lo cual incluye la notificación semanal de casos y muertes; la gestión del conocimiento en relación con el reentrenamiento de los funcionarios; la promoción de la salud que involucra la participación comunitaria; la prevención primaria de la transmisión, que está en relación directa con la reducción de la exposición al vector, control de criaderos, uso de larvicidas, rociado residual intradomiciliario y uso de toldillos impregnados con insecticidas de larga duración (TILD); la atención integral de pacientes, lo cual incluye el diagnóstico, tratamiento y búsquedas activas; y la gestión y atención de contingencias como respuesta oportuna a la aparición de brotes (Ministerio de Salud y Protección Social y OPS, 2014).

## Referencias

- Achidi EA, Perlmann H, Berzins K. Asymptomatic malaria parasitaemia and seroreactivities to *Plasmodium falciparum* antigens in blood donors from Ibadan, south-western Nigeria. *Ann Trop Med Parasitol*. 1995;89:601–610.
- Alger J. Control y prevención de la malaria: tendencias globales. *Revista Médica Hondureña* 1998;66(2):54.
- 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;66:641–648.
- Anderson T, Haubold B, Williams J, Estrada-Franco J, Richardson L, Mollinedo R, et al. Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol*. 2000 Oct;17(10):1467-82.
- Anderson TJ, Su XZ, Bockarie M, Lagog M, Day KP. Twelve microsatellite markers for characterization of *Plasmodium falciparum* from finger-prick blood samples. *Parasitology*. 1999 Aug;119(Pt 2):113-25.
- Ariey F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois AC, Khim N, et al. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2014 Jan;505(7481):50-5. doi: 10.1038/nature12876. Epub 2013 Dec 18.
- Auburn S, Barry AE. Dissecting malaria biology and epidemiology using population genetics and genomics. *Int J Parasitol*. 2017 Feb;47(2-3):77-85. doi: 10.1016/j.ijpara.2016.08.006. Epub 2016 Nov 5.
- Aydin-Schmidt B, Xu W, González IJ, Polley SD, Bell D, Shakely D, Msellem MI, Björkman A, Mårtensson A. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) accurately detects malaria DNA from filter paper blood samples of low density parasitaemias. *PLoS One*. 2014 Aug;9(8):e103905. doi: 10.1371/journal.pone.0103905. eCollection 2014.
- Babiker HA, Abdel-Muhsin AM, Ranford-Cartwright LC, Satti G, Walliker D. Characteristics of *Plasmodium falciparum* parasites that survive the lengthy dry season in eastern Sudan where malaria transmission is markedly seasonal. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1998;59:582–590.
- Baniecki ML, Faust AL, Schaffner SF, Park DJ, Galinsky K, Daniels R.F, et al. Development of a single nucleotide polymorphism barcode to genotype *Plasmodium vivax* infections. *PLoS Negl*. 2015Mar 17;9(3):e0003539. doi: 10.1371/journal.pntd.0003539. eCollection 2015 Mar.
- Barnes KI, Little F, Mabuza A, Mngomezulu N, Govere J, Durrheim D, Roper C, Watkins B, White NJ. Increased gametocytemia after treatment: An early parasitological indicator of emerging sulfadoxine-pyrimethamine resistance in falciparum malaria. *J Infect Dis*. 2008;197: 1605–1613.
- Barnes KI, White NJ. Population biology and antimalarial resistance: The transmission of antimalarial drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Acta Tropica*. 2005;94: 230–240.

Baton LA, Ranford-Cartwright LC. Spreading the seeds of millionmurdering death: metamorphoses of malaria in the mosquito. *Trends Parasitol.* 2005;21:573-80; PMID:16236552; <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2005.09.012>.

Baum E, Badu K, Molina DM, Liang X, Felgner PL, Yan G. Protein microarray analysis of antibody responses to *Plasmodium falciparum* in western Kenyan highland sites with differing transmission levels. *PLoS One.* 2013 Dec;8(12):e82246. doi: 10.1371/journal.pone.0082246. eCollection 2013.

Bennink S, Kiesow MJ, Pradel G. The development of malaria parasites in the mosquito midgut. *Cell Microbiol.* 2016 Jul;18(7):905-18. doi: 10.1111/cmi.12604. Epub 2016 May 24.

Bin Mohanna MA, Bin Ghouth AS, Rajaa YA: Malaria signs and infection rate among asymptomatic schoolchildren in Hajr Valley, Yemen. *East Mediterr Health J.* 2007;13:35–40.

Blair S. Retos para la eliminación de la malaria en Colombia: un problema de saber o de poder. *Biomédica* 2012;32(Supl.):131-48.

Bogreau H, Renaud F, Bouchiba H, Durand P, Assi S-B, Henry M-C, et al. Genetic diversity and structure of African *Plasmodium falciparum* populations in urban and rural areas. *Am J Trop Med Hyg.* 2006 Jun;74(6):953–9.

Borrero E, Carrasquilla G, Alexander N. Descentralización y reforma: ¿cuál es su impacto sobre la incidencia de malaria en los municipios colombianos?. *Biomédica* 2012;32(Supl.):68-78.

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 Jan-Feb;90(1):15-9.

Bousema JT, Gouagna LC, Drakeley CJ, Meutstege AM, Okech BA, Akim IN, Beier JC, Githure JI, Sauerwein RW: *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage in asymptomatic children in western Kenya. *Malar J.* 2004;3:18.

Bousema JT, Roeffen W, van der Kolk M, de Vlas SJ, van de Vegte-Bolmer M, Bangs MJ, Teelen K, Kurniawan L, Maguire JD, Baird JK, Sauerwein RW. Rapid onset of transmission-reducing antibodies in javanese migrants exposed to malaria in papua, indonesia. *Am J Trop Med Hyg.* 2006 Mar;74(3):425-31.

Bousema T, Dinglasan RR, Morlais I, Gouagna LC, van Warmerdam T, Awono-Ambene PH, Bonnet S, Diallo M, Coulibaly M, Tchuinkam T, Mulder B, Targett G, Drakeley C, Sutherland C, Robert V, Doumbo O, Touré Y, Graves PM, Roeffen W, Sauerwein R, Birkett A, Locke E, Morin M, Wu Y, Churcher TS. Mosquito feeding assays to determine the infectiousness of naturally infected *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers. *PLoS One.* 2012;7(8):e42821. doi: 10.1371/journal.pone.0042821. Epub 2012 Aug 22.

Bousema T, Okell L, Felger I, Drakeley C. Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. *Nat Rev Microbiol.* 2014 Dec;12(12):833-40. doi: 10.1038/nrmicro3364. Epub 2014 Oct 20.

Branch O, Casapia WM, Gamboa DV, Hernandez JN, Alava FF, Roncal N, Alvarez E, Perez EJ, Gotuzzo E. Clustered local transmission and asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria infections in a recently emerged, hypoendemic Peruvian Amazon community. *Malar J.* 2005; 4:27.

Bruce MC, Alano P, Duthrie S, Carter R. Commitment of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* to sexual and asexual development. *Parasitology* 1990; 100:191-200; PMID:2189114; <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182000061199>.

Carmona-Fonseca J. La malaria en Colombia, Antioquia y las zonas de Urabá y Bajo Cauca: panorama para interpretar la falla terapéutica antimalárica. Parte 1. *Iatreia.* 2003;16(4):300-18.

Castro MC. Malaria Transmission and Prospects for Malaria Eradication: The Role of the Environment. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017 Oct 3;7(10). pii: a025601. doi: 10.1101/cshperspect.a025601.

Cerutti C Jr, Boulos M, Coutinho AF, HatabMdo C, Falqueto A, Rezende HR, Duarte AM, Collins W, Malafronte RS: Epidemiologic aspects of the malaria transmission cycle in an area of very low incidence in Brazil. *Malar J.* 2007;6:33.

Chenet SM1, Schneider KA, Villegas L, Escalante AA. Local population structure of *Plasmodium*: impact on malaria control and elimination. *Malaria J.* 2012;11(11), 412.

Churcher TS, Bousema T, Walker M, Drakeley C, Schneider P, Ouédraogo AL, Basáñez MG. Predicting mosquito infection from *Plasmodium falciparum* gametocyte density and estimating the reservoir of infection. *Elife.* 2013 May 21;2:e00626. doi: 10.7554/eLife.00626.

Cibulskis RE, Aregawi M, Williams R, Otten M, Dye C. Worldwide incidence of malaria in 2009: Estimates, time trends, and a critique of methods. *PLoS Med.* 2011;8(12): e1001142.

Coleman RE, Maneechai N, Rachaphaew N, Kumpitak C, Miller RS, Soyseng V, Thimasarn K, Sattabongkot J: Comparison of field and expert laboratory microscopy for active surveillance for asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in western Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;67:141–144.

COMISCA-Consejo de Ministros de Salud de Centroamérica y Rca. Dominicana, MCR-Mecanismo de Coordinación Regional, SICA-Sistema de la Integración Centroamericana. Eliminación de la malaria en América Central y la Isla La Española (2015-2020). 2015.

Crookston BT, Alder SC, Boakye I, Merrill RM, Amuasi JH, Porucznik CA, Stanford JB, Dickerson TT, Dearden KA, Hale DC, Sylverken J, Snow BS, Osei-Akoto A, Ansong D. Exploring the relationship between chronic undernutrition and asymptomatic malaria in Ghanaian children. *Malar J.* 2010;9:39.

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 Feb;107(2):129-36. doi: 10.1093/trstmh/trs021. Epub 2012 Dec 2.

Cucunubá ZM, Guerra AP, Rahirant SJ, Rivera JA, Cortés LJ, Nicholls RS. Asymptomatic *Plasmodium* spp. infection in Tierralta, Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008 Nov;103(7):668-73.

Dal-Bianco MP, Köster KB, Kombila UD, Kun JF, Grobusch MP, Ngoma GM, Matsiegui PB, Supan C, Salazar CL, Missinou MA, Issifou S, Lell B, Kremsner P. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection in Gabonese adults. Am J Trop Med Hyg. 2007 Nov;77(5):939-42.

de Andrade AL, Martelli CM, Oliveira RM, Arias JR, Zicker F, Pang L: High prevalence of asymptomatic malaria in gold mining areas in Brazil. Clin Infect Dis. 1995;20:475.

de Meeûs T, McCoy KD, Prugnolle F, Chevillon C, Durand P, Hurtrez-Boussès S, Renaud F. Population genetics and molecular epidemiology or how to "débusquer la bête". Infect Genet Evol. 2007 Mar;7(2):308-32. Epub 2006 Sep 1.

Delgado-Ratto C, Gamboa D, Soto-Calle VE, Van den Eede P, Torres E, Sanchez-Martinez L, Contreras-Mancilla J, Rosanas-Urgell A, Rodriguez Ferrucci H, Llanos-Cuentas A, Erhart A, Van Geertruyden JP, D'Alessandro U. Population Genetics of *Plasmodium vivax* in the Peruvian Amazon. PLoS Negl. Trop. Dis. 2016 Jan 14;10(1):e0004376. doi: 10.1371/journal.pntd.0004376. eCollection 2016 Jan.

Departamento Administrativo Nacional de Estadística-DANE. Estimaciones y proyecciones de población 1985 – 2020. Disponible en: <https://geoportal.dane.gov.co/laboratorio/estimaciones/indicador1.html>.

Drakeley C, Sutherland C, Bousema JT, Sauerwein RW, Targett GA. The epidemiology of *Plasmodium falciparum* gametocytes: Weapons of mass dispersion. Trends Parasitol. 2006;22: 424–430.

Drakeley CJ, Flobbe K, Greenwood BM, Targett GA. *Plasmodium falciparum* gametocytes in Gambian adults. Ann Trop Med Parasitol. 2000 Jun;94(4):399-401.

Dunyo S, Milligan P, Edwards T, Sutherland C, Targett G, Pinder M. Gametocytaemia after drug treatment of asymptomatic *Plasmodium falciparum*. PLoS Clin Trials. 2006 Aug 18;1(4):e20.

Durand P, Michalakis Y, Cestier S, Oury B, Leclerc MC, Tibayrenc M, Renaud F. Significant linkage disequilibrium and high genetic diversity in a population of *Plasmodium falciparum* from an area (Republic of the Congo) highly endemic for malaria. Am J Trop Med Hyg. 2003;68: 345–349.

Echeverry DF, Deason NA, Davidson J, Makuru V, Xiao H, Niedbalski J, Kern M, Russell TL, Burkot TR, Collins FH, Lobo NF. Human malaria diagnosis using a single-step direct-PCR based on the *Plasmodium* cytochrome oxidase III gene. Malar J. 2016 Feb 29;15:128. doi: 10.1186/s12936-016-1185-x.

Eke RA, Chigbu LN, Nwachukwu W. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium* infection in a suburb of Aba Town, Nigeria. Ann of Afr Med. 2006;5:42–45.

El-Hassan I, Hviid L, Jakobsen P, Giha H, Satti GM, Arnot D et al. High proportion of sub-clinical *Plasmodium falciparum* infections in an area of seasonal and unstable malaria in Sudan. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1995;53:78-83.

Elliott SR, Fowkes FJ, Richards JS, Reiling L, Drew DR, Beeson JG. Research priorities for the development and implementation of serological tools for malaria surveillance. *F1000Prime Rep.* 2014 Nov 4;6:100. doi: 10.12703/P6-100. eCollection 2014.

European Nucleotide Archive [Página de inicio en Internet]. Wellcome Genome Campus, Hinxton, Cambridgeshire, CB10 1SD, UK: EMBL-EBI; 2018-[ acceso 12 de marzo de 2018]. Disponible en: <http://www.ebi.ac.uk/ena/home>.

Farooq U, Dubey ML, Shrivastava SK, Mahajan RC. Genetic polymorphism in *Plasmodium falciparum*: differentiation of parasite isolates of high & low virulence by RAPD. *Indian J Med Res.* 2012 Aug;136(2):292–5.

Fenton B, Walker A, Walliker D. Protein variation in clones of *Plasmodium falciparum* detected by twodimensional electrophoresis. *Mol Biochem Parasitol.* 1985;16:173-83.

Fernando SD, Abeyasinghe RR, Galappaththy GN, Rajapaksa LC. Absence of asymptomatic malaria infections in previously high endemic areas of Sri Lanka. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81:763–767.

Franco S. El paludismo en América Latina. Guadalajara: Editorial Universidad de Guadalajara;1990.

Frénal K, Dubremetz JF, Lebrun M, Soldati-Favre D. Gliding motility powers invasion and egress in Apicomplexa. *Nat Rev Microbiol.* 2017 Nov;15(11):645-660. doi: 10.1038/nrmicro.2017.86. Epub 2017 Sep 4.

Fugikaha E, Fornazari PA, Penhalbel Rde S, Lorenzetti A, Maroso RD, Amoras JT, Saraiva AS, Silva RU, Bonini-Domingos CR, Mattos LC, Rossit AR, Cavasini CE, Machado RL: Molecular screening of *Plasmodium* spp. Asymptomatic carriers among transfusion centers from Brazilian Amazon region. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2007;49:1–4.

Gabryszewski SJ, Modchang C, Musset L, Chookajorn T, Fidock DA. Combinatorial Genetic Modeling of *pfcr*-Mediated Drug Resistance Evolution in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol.* 2016 Jun;33(6):1554-70. doi: 10.1093/molbev/msw037. Epub 2016 Feb 22.

Garnham P. Malaria parasites and other haemosporidia. Oxford: Blackwell Scientific Publications Ltd; 1966.

Giha HA, Rosthoj S, Doodoo D, Hviid L, Satii GM, Scheike T et al. The epidemiology of febrile malaria episodes in an area of unstable and seasonal transmission. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000;94:645-51.

Gouagna LC, Bancone G, Yao F, Yameogo B, Dabire KR, Costantini C, Simpore J, Ouédraogo JB, Modiano D. Genetic variation in human HBB is associated with *Plasmodium falciparum* transmission. *Nat Genet.* 2010;42: 328–331.

Gregson A, Plowe CV. Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates. *Pharmacological reviews.* 2005; 57(1):117-45.

Griffing S, Mixson-Hayden T, Sridaran S, Alam M, McCollum A, 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.

Harris I, Sharrock WW, Bain LM, Gray KA, Bobogare A, Boaz L, Lilley K, Krause D, Valley A, Johnson ML, Gatton ML, Shanks GD, Cheng Q: A large proportion of asymptomatic *Plasmodium* infections with low and sub-microscopic parasite densities in the low transmission setting of Temotu Province, Solomon Islands: challenges for malaria diagnostics in an elimination setting. *Malar J.* 2010;9:254.

Hay SI, Rogers DJ, Toomer JF, Snow RW. Annual *Plasmodium falciparum* entomological inoculation rates (EIR) across Africa: Literature survey, Internet Access and review. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000;94(2):113–127.

Helb DA, Tetteh KK, Felgner PL, Skinner J, Hubbard A, Arinaitwe E, et al. Novel serologic biomarkers provide accurate estimates of recent *Plasmodium falciparum* exposure for individuals and communities. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Aug 11;112(32):E4438-47. doi: 10.1073/pnas.1501705112.

Herrera S, Vallejo AF, Quintero JP, Arévalo-Herrera M, Cancino M, Ferro S. Field evaluation of an automated RDT reader and data management device for *Plasmodium falciparum/Plasmodium vivax* malaria in endemic areas of Colombia. *Malar J.* 2014 Mar 10;13:87. doi: 10.1186/1475-2875-13-87.

Herrera S, Gómez A, Vera O, Vergara J, Valderrama-Aguirre A, Maestre A, Méndez F, Wang R, Chitnis CE, Yazdani SS, Arévalo-Herrera M. Antibody response to *Plasmodium vivax* antigens in Fy-negative individuals from the Colombian Pacific coast. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73 (Suppl. 5), 44–49.

Hopkins H, González IJ, Polley SD, Angutoko P, Ategeka J, Asiiimwe C, Agaba B, Kyabayinze DJ, Sutherland CJ, Perkins MD, Bell D. Highly sensitive detection of malaria parasitemia in a malaria-endemic setting: performance of a new loop-mediated isothermal amplification kit in a remote clinic in Uganda. *J Infect Dis.* 2013 Aug 15;208(4):645-52.

Hyde JE, Dittrich S, Wang P, Sims PF, de Crécy-Lagard V, Hanson AD. *Plasmodium falciparum*: a paradigm for alternative folate biosynthesis in diverse microorganisms?. *Trends Parasitol.* 2008 Nov;24(11):502-8. doi: 10.1016/j.pt.2008.08.004. Epub 2008 Sep 19.

Instituto Nacional de Salud. Informe del evento malaria, hasta el periodo epidemiológico XIII, Colombia, 2017. 2017.

Instituto Nacional de Salud. Informe del evento malaria. 2016. 2016.

John CC, Riedesel MA, Magak NG, Lindblade KA, Menge DM, Hodges JS, Vulule JM, Akhwale W: Possible interruption of malaria transmission, highland Kenya, 2007–2008. *Infect Dis.* 2009;15:1917–1924.

Joice R, Nilsson SK, Montgomery J, Dankwa S, Egan E, Morahan B, Seydel KB, Bertuccini L, Alano P, Williamson KC, et al. *Plasmodium falciparum* transmission stages accumulate in the human bone marrow. *Sci Transl Med* 2014; 6:244re5; PMID:25009232;

Kirchner S, Power BJ, Waters AP. Recent advances in malaria genomics and epigenomics. *Genome Med.* 2016 Sep 7;8(1):92. doi: 10.1186/s13073-016-0343-7.

Klein Klouwenberg PM, Oyakhirome S, Schwarz NG, Gläser B, Issifou S, Kiessling G, Klöpfer A, Kremsner PG, Längin M, Lassmann B, Necek M, Pötschke M, Ritz A,



Grobusch MP: Malaria and asymptomatic parasitaemia in Gabonese infants under the age of 3 months. *Acta Trop.* 2005;95:81–85.

Laishram DD, Sutton PL, Nanda N, Sharma VL, Sobti RC, Carlton JM, Joshi H. The complexities of malaria disease manifestations with a focus on asymptomatic malaria. *Malar J.* 2012 Jan 31;11:29. doi: 10.1186/1475-2875-11-29.

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.

Leclerc MC, Durand P, de Meeus T, Robert V, Renaud F. Genetic diversity and population structure of *Plasmodium falciparum* isolates from Dakar, Senegal, investigated from microsatellite and antigen determinant loci. *Microbes Infect.* 2002;4: 685–692.

Lee PW, Liu CT, Rampao HS, do Rosario VE, Shaio MF: Pre-elimination of malaria on the island of Príncipe. *Malar J.* 2010;9:26.

Li P, Zhao Z, Wang Y, Xing H, Parker DM, Yang Z, Baum E, Li W, Sattabongkot J, Sirichaisinthop J, Li S, Yan G, Cui L, Fan Q. Nested PCR detection of malaria directly using blood filter paper samples from epidemiological surveys. *Malar J.* 2014 May 8;13:175. doi: 10.1186/1475-2875-13-175.

Malaria Genomic Epidemiology Network (MalariaGEN) [Página de inicio en Internet]. University of Oxford, UK; 2018-[ acceso 12 de marzo de 2018].SpotMalaria. Disponible en:<https://www.malariagen.net/projects/spotmalaria>.

Marcano TJ, Morgado A, Tosta CE, Coura JR: Cross-sectional study defines difference in malaria morbidity in two Yanomami communities on Amazonian boundary between Brazil and Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004;99:369–376.

Marques PX, Saúte F, Pinto VV, Cardoso S, Pinto J, Alonso PL et al. *Plasmodium* species mixed infections in two areas of Manhiça District, Mozambique. *Int J Biol Sci.* 2005;1:96-102.

Meibalan E, Marti M. Biology of Malaria Transmission. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017 Mar 1;7(3). pii: a025452. doi: 10.1101/cshperspect.a025452.

Mendoza NM, Cucunubá ZM, Aponte S, González NE, Bernal SD. Field evaluation for diagnostic accuracy of the rapid test SD Bioline Malaria Antigen Pf/Pv® in Colombia. *Biomedica.* 2013 Oct-Dec;33(4):587-97.

Ministerio de la Protección Social. República de Colombia. Dirección General de Salud Pública. Instituto Nacional de Salud. Organización Panamericana de la Salud OPS/ OMS. Guía para Atención Clínica Integral del paciente con malaria. Bogotá, 2010. [https://www.paho.org/col/index.php?option=com\\_docman&view=download&category\\_slug=publicaciones-ops-oms-colombia&alias=1220-guia-para-la-atencion-clinica-integral-del-paciente-con-malaria&Itemid=688](https://www.paho.org/col/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=publicaciones-ops-oms-colombia&alias=1220-guia-para-la-atencion-clinica-integral-del-paciente-con-malaria&Itemid=688).

Ministerio de Salud y Protección Social. Plan Decenal de Salud Pública 2012-2021: La salud en Colombia la construyes tú. Bogotá, 2013. Disponible en

<https://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/Plan%20Decenal%20-%20Documento%20en%20consulta%20para%20aprobaci%C3%B3n.pdf>.

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.

Ministerio de Salud y Protección Social. Análisis de Situación de Salud. Colombia, 2015. <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/ED/PSP/asis-colombia-2016.pdf>.

Ministerio del Trabajo. República de Colombia. Perfil productivo de Guapi. 2013.

Mngomezulu N, Govere J, Durrheim D, Roper C, Watkins B, White NJ. Increased gametocytemia after treatment: An early parasitological indicator of emerging sulfadoxine-pyrimethamine resistance in *falciparum* malaria. *J Infect Dis*. 2008;197: 1605–1613.

Montoya AE, Menco J, Osorio N, Zuluaga MA, Duque J, Torres G, Restrepo M. Concordance between thick blood smear, immunochromatography and polymerase chain reaction for malaria diagnosis. *Biomedica*. 2008 Jun;28(2):252-61.

Mosha JF, Sturrock HJ, Greenhouse B, Greenwood B, Sutherland CJ, Gadalla N, Atwal S, Drakeley C, Kibiki G, Bousema T, Chandramohan D, Gosling R. Epidemiology of subpatent *Plasmodium falciparum* infection: implications for detection of hotspots with imperfect diagnostics. *Malar J*. 2013 Jul 1;12:221. doi: 10.1186/1475-2875-12-221.

Moss WJ, Dorsey G, Mueller I, Laufer MK, Krogstad DJ, Vinetz JM, et al.; International Centers of Excellence for Malaria Research. Malaria Epidemiology and Control Within the International Centers of Excellence for Malaria Research. *Am J Trop Med Hyg*. 2015 Sep;93(3 Suppl):5-15. doi: 10.4269/ajtmh.15-0006.

Murillo Solano C, Akinyi Okoth S, Abdallah JF, Pava Z, Dorado E, Incardona S, Huber CS, Macedo de Oliveira A, Bell D, Udhayakumar V, Barnwell JW. Deletion of *Plasmodium falciparum* Histidine-Rich Protein 2 (pfhrp2) and Histidine-Rich Protein 3 (pfhrp3) Genes in Colombian Parasites. *PLoS One*. 2015 Jul 7;10(7):e0131576.

Nacher M, Singhasivanon P, Silachamroon U, Treeprasertsuk S, Tosukhowong T, Vannaphan S, Gay F, Mazier D, Loareesuwan S. Decreased hemoglobin concentrations, hyperparasitemia, and severe malaria are associated with increased *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage. *J Parasitol*. 2002;88: 97–101.

Njama-Meya D, Kamya MR, Dorsey G: Asymptomatic parasitaemia as a risk factor for symptomatic malaria in a cohort of Ugandan children. *Trop Med Int Health*. 2004;9:862–868.

Nkoghe D, Akue JP, Gonzalez JP, Leroy EM: Prevalence of *Plasmodium falciparum* infection in asymptomatic rural Gabonese populations. *Malar J*. 2011;10:33.

Ohrt C, Mirabelli-Primdahl L, Karnasuta C, Chantakulkij S, Kain KC. Distinguishing *Plasmodium falciparum* treatment failures from reinfections by restrictions fragment length polymorphism and polymerase chain reaction genotyping. *Am J Trop Med Hyg*. 1997 Oct;57(4):430–7.

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. doi: 10.1038/ncomms2241.

Organización Mundial de la Salud (OMS). (a). Terminología del Paludismo. Ginebra, 2017. WHO/HTM/GMP/2016.6. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/258964/WHO-HTM-GMP-2016.6-spa.pdf?sequence=1>.

Organización Mundial de la Salud (OMS). (b). Erradicación del paludismo. Informe de la Secretaría. CONSEJO EJECUTIVO EB141/3. 141.<sup>a</sup> reunión 18 de mayo de 2017. Disponible en: [http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/EB141/B141\\_3-sp.pdf](http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EB141/B141_3-sp.pdf).

Organización Mundial de la Salud. Organización Panamericana de la Salud (OMS.OPS). ESTRATEGIA Y PLAN DE ACCIÓN SOBRE LA MALARIA. 51.º Consejo Directivo 63.A Sesión del Comité Regional. CD51/11 (Esp.). 2011. Washington, D.C., EUA. Disponible en: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2011/CD51.R9-s.pdf>.

Organización Mundial de la Salud (OMS). Estrategia Técnica Mundial contra la Malaria 2016-2030. 2015. Disponible en: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/186671/9789243564999\\_spa.pdf;jsessionid=EBBA2F8E1074322F9C2A84211793981E?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/186671/9789243564999_spa.pdf;jsessionid=EBBA2F8E1074322F9C2A84211793981E?sequence=1).

Organización Mundial de la Salud. Organización Panamericana de la Salud (OMS.OPS). Report on the Situation of Malaria in the Americas 2000 – 2015. 2017: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_details&gid=41888&Itemid=270&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_details&gid=41888&Itemid=270&lang=es).

Osorio L, Todd J, Bradley D. Ausencia de malaria asintomática en escolares de Quibdó, Chocó. *Biomédica.* 2004;24:13-19.

Ouédraogo AL, de Vlas SJ, Nébié I, Ilboudo-Sanogo E, Bousema JT, Ouattara AS, Verhave JP, Cuzin-Ouattara N, Sauerwein RW. Seasonal patterns of *Plasmodium falciparum* gametocyte prevalence and density in a rural population of Burkina Faso. *Acta Trop.* 2008 Jan;105(1):28-34. Epub 2007 Sep 21.

Owusu-Agyei S, Koram KA, Baird JK, Utz GC, Binka FN, Nkrumah FK, Fryauff DJ, Hoffman SL: Incidence of symptomatic and asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection following curative therapy in adult residents of Northern Ghana. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;65:197–203.

Pava Z, Echeverry DF, Díaz G, Murillo C. Large variation in detection of histidine-rich protein 2 in *Plasmodium falciparum* isolates from Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2010 Oct;83(4):834-7. doi: 10.4269/ajtmh.2010.10-0075. Erratum in: *Am J Trop Med Hyg.* 2010 Dec;83(6):1356.

Phillips MA, Burrows JN, Manyando C, van Huijsduijnen RH, Van Voorhis WC, Wells TNC. Malaria. *Nat Rev Dis Primers.* 2017 Aug 3;3:17050. doi: 10.1038/nrdp.2017.50.

Polley SD, Mori Y, Watson J, et al. Mitochondrial DNA targets increase sensitivity of malaria detection using loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol.* 2010; 48:2866–71.

Price R, Nosten F, Simpson JA, Luxemburger C, Phaipun L, ter Kuile F, van Vugt M, Chongsuphajaisiddhi T, White NJ. Risk factors for gametocyte carriage in uncomplicated falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;60:1019–1023.

Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD). Los Afrocolombianos frente a los Objetivos de Desarrollo del Milenio. 2012. Disponible en <http://www.undp.org/content/dam/colombia/docs/ODM/undp-co-odmafrocolombianos-2012.pdf>.

Programa nacional de promoción, prevención y control de enfermedades transmitidas por vectores y zoonosis (PyP ETV). Lineamiento para la asignación y ejecución de transferencias nacionales de funcionamiento e inversión 2017 y otras consideraciones para la operación del programa en el marco de la estrategia de gestión integrada. 2017. <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/PAI/Lineamiento-programa-pyp-control-enfermedades-transmitidas-vectores-2017.pdf>.

Recht J, Siqueira AM, Monteiro WM, Herrera SM, Herrera S, Lacerda MVG. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: current challenges in malaria control and elimination. *Malar J.* 2017 Jul 4;16(1):273. doi: 10.1186/s12936-017-1925-6.

Remme JH, Binka F, Nabarro D. Toward a framework and indicators for monitoring Roll Back Malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2001 Jan-Feb;64(1-2 Suppl):76-84.

Richards AK, Smith L, Mullany LC, Lee CI, Whichard E, Banek K, Mahn M, ShweOo EK, Lee TJ. Prevalence of *Plasmodium falciparum* in active conflict areas of eastern Burma: a summary of cross-sectional data. *Confl Health.* 2007;1:9.

Roper MH, Torres RS, Goicochea CG, Andersen EM, Guarda JS, Calampa C, Hightower AW, Magill AJ. The epidemiology of malaria in an epidemic area of the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* 2000;62:247–256.

Roshanravan B, Kari E, Gilman RH, Cabrera L, Lee E, Metcalfe J, Calderon M, Lescano AG, Montenegro SH, Calampa C, Vinetz JM: Endemic malaria in the Peruvian Amazon region of Iquitos. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;69:45–52.

Sema M, Alemu A, Bayih AG, Getie S, Getnet G, Guelig D, Burton R, LaBarre P, Pillai DR. Evaluation of non-instrumented nucleic acid amplification by loop-mediated isothermal amplification (NINA-LAMP) for the diagnosis of malaria in Northwest Ethiopia. *Malar J.* 2015 Jan 28;14:44. doi: 10.1186/s12936-015-0559-9.

Silvestrini F, Tiburcio M, Bertuccini L, Alano P. Differential adhesive properties of sequestered asexual and sexual stages of *Plasmodium falciparum* on human endothelial cells are tissue independent. *PloS One* 2012; 7:e31567; PMID:22363675

Smalley ME, Abdalla S, Brown J. The distribution of *Plasmodium falciparum* in the peripheral blood and bone marrow of Gambian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1981; 75:103-5; PMID:7022784; [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(81\)90019-5](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(81)90019-5).

Smith DL, Dushoff J, Snow RW, Hay SI. The entomological inoculation rate and *Plasmodium falciparum* infection in African children. *Nature.* 2005;438(7067):492–495.

Smith DL, McKenzie FE, Snow RW, Hay SI. Revisiting the basic reproductive number for malaria and its implications for malaria control. *PLoS Biol.* 2007 Mar;5(3):e42.

- Smith TA, Chitnis N, Penny M, Tanner M. Malaria Modeling in the Era of Eradication. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017 Apr 3;7(4). pii: a025460. doi: 10.1101/cshperspect.a025460.
- Sturrock HJ, Hsiang MS, Cohen JM, Smith DL, Greenhouse B, Bousema T, Gosling RD. Targeting asymptomatic malaria infections: active surveillance in control and elimination. *PLoS Med.* 2013 Jun;10(6):e1001467. doi: 10.1371/journal.pmed.1001467. Epub 2013 Jun 18.
- Suárez-Mutis MC, Cuervo P, Leoratti FM, Moraes-Avila SL, Ferreira AW, Fernandes O, Coura JR. Cross sectional study reveals a high percentage of asymptomatic *Plasmodium vivax* infection in the Amazon Rio Negro area, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2007 May-Jun;49(3):159-64.
- Sutton PL. A call to arms: on refining *Plasmodium vivax* microsatellite marker panels for comparing global diversity. *Malaria J.* 2013;12, 447.
- Tada MS, Marques RP, Mesquita E, Dalla Martha RC, Rodrigues JA, Costa JD, Pepelascov RR, Katsuragawa TH, Pereira-da-Silva LH. Urban malaria in the Brazilian Western Amazon Region I: high prevalence of asymptomatic carriers in an urban riverside district is associated with a high level of clinical malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007 Jun;102(3):263-9.
- Takala-Harrison S, Laufer MK. Antimalarial drug resistance in Africa: Key lessons for the future. *AnnNYAcad Sci.* 2015;1342: 62–67.
- Talman AM, Domarle O, McKenzie FE, Ariey F, Robert V. Gametocytogenesis: the puberty of *Plasmodium falciparum*. *Malar J.* 2004 Jul 14;3:24.
- Tanner M, Beck HP, Felger I, Smith T. The epidemiology of multiple *Plasmodium falciparum* infections. 1. General introduction. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999 Feb;93 Suppl 1:1-2.
- Taylor BJ, Martin KA, Arango E, Agudelo OM, Maestre A, Yanow SK. Real-time PCR detection of *Plasmodium* directly from whole blood and filter paper samples. *Malar J.* 2011 Aug 19;10:244. doi: 10.1186/1475-2875-10-244.
- Trager W, Gill GS. Enhanced gametocyte formation in young erythrocytes by *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *J Protozool.* 1992;39: 429–432.
- Tusting LS, Bousema T, Smith DL, Drakeley C. Measuring changes in *Plasmodium falciparum* transmission: precision, accuracy and costs of metrics. *Adv Parasitol.* 2014;84:151-208. doi: 10.1016/B978-0-12-800099-1.00003-X.
- Valderramos SG, Fidock DA. Transporters involved in resistance to antimalarial drugs. *Trends Pharmacol Sci.* 2006 Nov;27(11):594-601. Epub 2006 Sep 25.
- Valero-Bernal MV. Malaria in Colombia: Retrospective Glance during the Past 40 Years. *Rev Salud Pública.* 2006;8 (3):141-149.
- 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 Jan 8;9(1):e3453. doi: 10.1371/journal.pntd.0003453. eCollection 2015 Jan.

Vásquez-Jiménez JM, Arévalo-Herrera M, Henao-Giraldo J, Molina-Gómez K, Arce-Plata M, Vallejo AF, Herrera S. Consistent prevalence of asymptomatic infections in malaria endemic populations in Colombia over time. Malar J. 2016 Feb 6;15:70. doi: 10.1186/s12936-016-1124-x.

Walker DM, Oghumu S, Gupta G, McGwire BS, Drew ME, Satoskar AR. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. Cell Mol Life Sci. 2014 Apr;71(7):1245-63. doi: 10.1007/s00018-013-1491-1.

Walliker D, Quakyi IA, Wellems TE, McCutchan TF, Szarfman A, London WT et al. Genetic analysis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Science. 1987;236:1661-6;

Wang B, Han SS, Cho C, Han JH, Cheng Y, Lee SK, Galappaththy GN, Thimasarn K, Soe MT, Oo HW, Kyaw MP, Han ET. Comparison of microscopy, nested-PCR, and Real-Time-PCR assays using high-throughput screening of pooled samples for diagnosis of malaria in asymptomatic carriers from areas of endemicity in Myanmar. J Clin Microbiol. 2014 Jun;52(6):1838-45. doi: 10.1128/JCM.03615-13. Epub 2014 Mar 19.

White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM. Malaria. Lancet. 2014 Feb 22;383(9918):723-35. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60024-0. Epub 2013 Aug 15.

World Health Organization (WHO). Eliminating malaria. 2016. Disponible en: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/205565/WHO\\_HTM\\_GMP\\_2016.3\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/205565/WHO_HTM_GMP_2016.3_eng.pdf)

World Health Organization (WHO). From malaria control to malaria elimination. Geneva. 2014. Disponible en: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112485/9789241507028\\_eng.pdf?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112485/9789241507028_eng.pdf?sequence=1).

World Health Organization (WHO). Guidelines for the treatment of malaria. Second edition. 2010. Disponible en: [http://www.searo.who.int/entity/malaria/documents/Glo\\_treatment\\_guide/en/](http://www.searo.who.int/entity/malaria/documents/Glo_treatment_guide/en/).

World Health Organization (WHO). World malaria report 2017. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259492/9789241565523-eng.pdf?sequence=1>.

Yalcindag E, Elguero E, Arnathau C, Durand P, Akiana J, Anderson TJ, et al. Multiple independent introductions of *Plasmodium falciparum* in South America. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Jan 10;109(2):511-6. doi: 10.1073/pnas.1119058109. Epub 2011 Dec 27.

Zoghi S, Mehrizi AA, Raeisi A, Haghdoost AA, Turki H, Safari R, Kahanali AA, Zakeri S. Survey for asymptomatic malaria cases in low transmission settings of Iran under elimination programme. Malar J. 2012 Apr 25;11:126. doi: 10.1186/1475-2875-11-126.

## **2. Objetivo específico 1**

### **2.1 Objetivo específico 1**

Estimar la prevalencia de malaria asintomática y portadores de gametocitos en el barrio Santa Mónica, Guapi-Cauca y en la vereda El Cuerval, Timbiquí-Cauca, Colombia.

### **2.2 Metodología**

#### **2.2.1 Tipo de estudio**

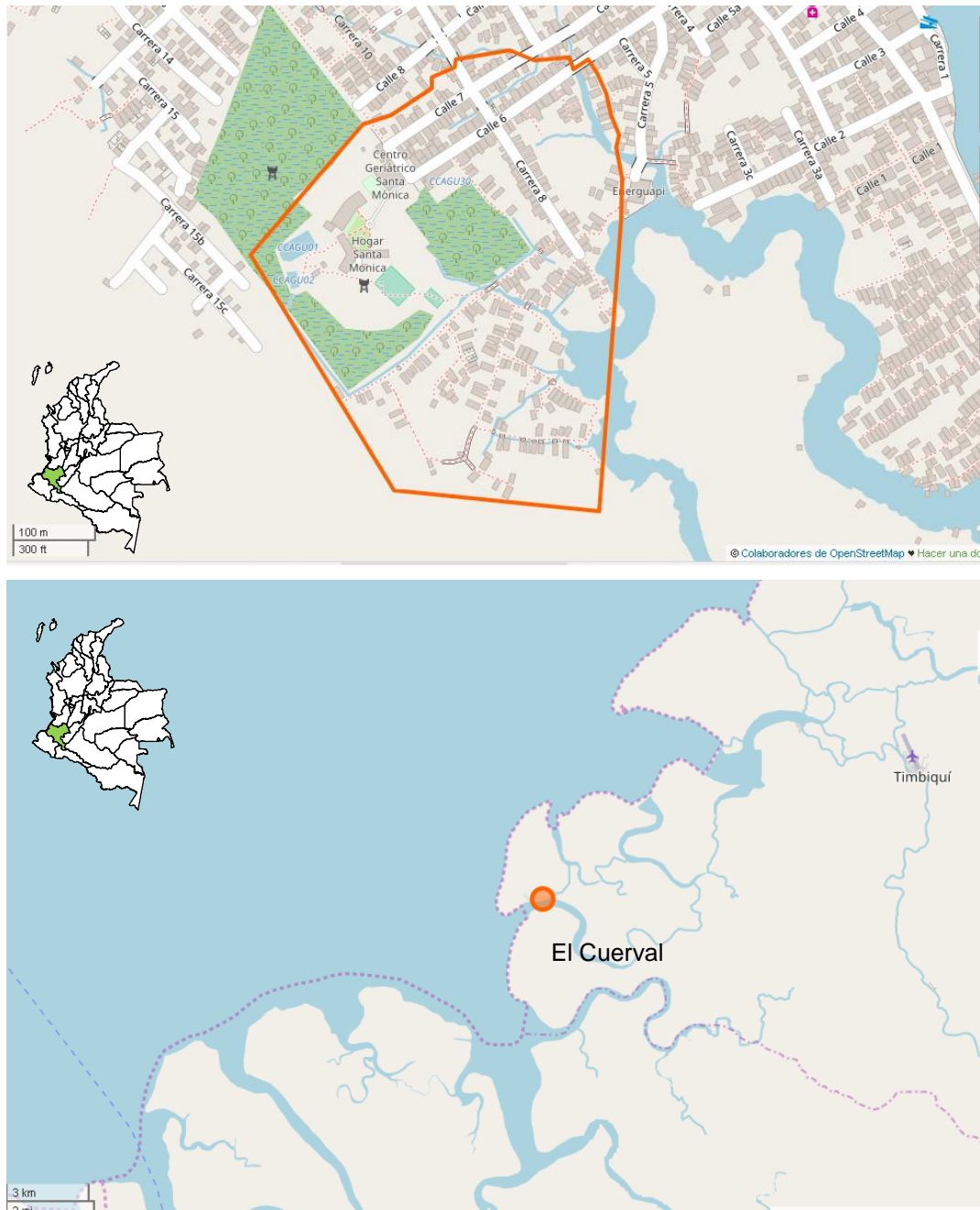
Estudio de corte transversal con cuatro mediciones en los años 2015 (marzo-abril y septiembre-octubre) y 2016 (marzo-abril y septiembre-octubre) en el barrio Santa Mónica de Guapi y dos mediciones más en diciembre de 2015 y mayo de 2017 en El Cuerval, Timbiquí. Se tomaron muestras de sangre venosa y gota gruesa en la población con el fin de realizar el diagnóstico microscópico y por PCR de la malaria asintomática.

#### **2.2.2 Sitio de estudio**

Santa Mónica es un barrio ubicado en la zona urbana del municipio de Guapi, departamento del Cauca (2°33'56.22"N, 77°53'8.43"W). Este barrio fue elegido para el estudio porque según información suministrada por la Oficina para el Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores (ETV) de la Secretaría Departamental de Salud del Cauca, allí se registraron en promedio 41 casos de malaria anuales entre 2007 y 2013, lo que lo ubica como una de las zonas con mayor número de casos de malaria urbana en el municipio. Los cuatro momentos de medición (marzo-abril y septiembre-octubre) durante los años 2015 y 2016 fueron escogidos con base en un estudio documental retrospectivo realizado con la información suministrada por la oficina ETV de la Secretaría Departamental de Salud del Cauca. En la vereda de El Cuerval (2°45'1.81"N, 77°47'59.40"W), ubicada en el municipio de Timbiquí, Cauca, se reportaron

en promedio 21 casos de malaria al año durante el período 2007 – 2013; por otra parte, según datos suministrados por la misma oficina, se registró un aumento inusitado de casos en el último periodo epidemiológico del año 2015 (Figura 2-1).

**Figura 2-1:** Mapa de sitios de procedencia de los individuos incluidos en el estudio. Santa Mónica, Guapi y El Cuerval, Timbiquí.





### **2.2.3 Comportamiento de la malaria en Guapi durante el periodo de estudio**

Se utilizó el diseño de los canales endémicos aplicando el método de la mediana y los cuartiles con el fin de monitorear del comportamiento de la malaria en el municipio, el departamento y el país. Con este diseño se generaron cuatro zonas de estimación del riesgo de la ocurrencia de malaria: una debajo del cuartil inferior o zona de éxito, una entre el cuartil inferior y la mediana o zona de seguridad, una entre la mediana y el cuartil superior o zona de alerta y una por encima del cuartil superior o zona epidémica (Orellano PW& Reynoso JI, 2011). Dicha información se obtuvo a partir de los registros del SIVIGILA y los datos proporcionados por la oficina ETV de la Secretaría Departamental de Salud del Cauca.

### **2.2.4 Definición de caso de malaria asintomática**

Presencia de formas asexuales de *Plasmodium spp.* en sangre periférica detectables a través de la microscopía de luz en ausencia de escalofríos, fiebre y sudoración; el conjunto completo de estos síntomas no debería haberse presentado durante la semana previa al momento de inclusión del participante. Para cumplir con la definición, el individuo debió mantenerse asintomático y con parasitemia asexual hasta el decimocuarto día de seguimiento (OMS, 2017).

### **2.2.5 Estudio de campo. Marco muestral. Censo**

Se visitó casa a casa el barrio Santa Mónica en Guapi, se hizo la georreferenciación de la vivienda y se recolectó información demográfica de cada integrante del hogar (nombre completo, edad, fecha de nacimiento, género y número de documento de identidad), con el fin de realizar la selección aleatoria de la muestra de la población en la cual se diagnosticó la malaria asintomática. Cada casa y cada uno de los individuos que habitaban las viviendas fueron identificados mediante números consecutivos.

### **2.2.6 Tamaño de muestra y selección de los individuos**

Se estimó que la prevalencia de malaria asintomática en áreas de transmisión baja e inestable como es el caso de Colombia puede variar alrededor de  $15 \pm 5\%$ , calculado a partir de un promedio de las frecuencias informadas en la literatura de acuerdo con

resultados de estudios realizados en países latinoamericanos, incluyendo a Colombia (Alves FP, et al., 2002; Marcano TJ, et al., 2004; Cerutti C Jr, et al., 2007; Fugikaha E, et al., 2007; Gil LH, et al., 2007; Suárez-Mutis MC, et al., 2007; Roper MH, et al., 2000; Roshanravan B, et al., 2003; Branch O, et al., 2005; Cucunubá ZM, et al., 2008; Cucunubá ZM, et al., 2013; Osorio L, 2004).

El cálculo de la muestra se realizó utilizando la fórmula (Dennis RJ & Pérez A, 2004):

$$n = \frac{Z^2 pq}{d^2}$$

En donde:

p = proporción esperada de malaria asintomática reportada en la literatura

q = 1 – p

d = error de muestreo del 1%

Z = 1,96 para un nivel de confianza del 95%

Aplicando dicha fórmula y teniendo en cuenta 15% de pérdidas, el número de individuos requeridos para el estudio se calculó en 300; sin embargo, debido a la baja cantidad de casos detectados en el primer muestreo, se decidió aumentar la muestra a 400 individuos.

Luego del censo se diseñó un plano del barrio con la ubicación de las viviendas y se realizó el muestreo aleatorio simple de los individuos (paquete estadístico Stata13®). En el muestreo se tuvieron en cuenta, además, los criterios de inclusión y exclusión de pacientes.

### **Criterios de inclusión**

- Individuos mayores de 2 años de edad.
- No tener ni haber presentado escalofríos, fiebre y sudoración en la última semana (los tres síntomas a la vez y durante todos los días de la semana previa), confirmado durante el examen físico practicado por el médico.
- Consentimiento informado del paciente o, en el caso de los niños, de su padre, madre o tutor responsable.

**Criterios de exclusión.**

- Pacientes diagnosticados con malaria durante la última semana y que estuviesen recibiendo o no tratamiento en el momento de la evaluación.
- Mujeres embarazadas.

En El Cuerval, Timbiquí, no se utilizaron procedimientos para calcular el tamaño muestral. En esta vereda se visitaron todas las casas y tanto la información como las muestras de sangre fueron obtenidas de los individuos que se encontraban durante la visita y que aceptaron participar en el estudio.

El presente estudio fue evaluado y aprobado en el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, mediante Acta número 127-14 del 1 de diciembre de 2014. Todos los individuos participantes en el estudio firmaron el documento de consentimiento informado (Anexo A: Consentimiento y asentimiento informado “Búsqueda Activa”).

**2.2.7 Recolección de la información, muestras de sangre y seguimiento de los individuos**

A los pacientes seleccionados se les aplicó una encuesta para la recolección de información demográfica, antecedentes de malaria, consumo de antimaláricos y datos clínicos. El examen físico incluyó la toma de temperatura axilar, tensión arterial y frecuencia respiratoria y cardiaca. A estos individuos se les tomó una muestra de 4 ml de sangre venosa en tubos con EDTA y se les hizo punción digital para realización de gota gruesa y diagnóstico parasitológico de la malaria por microscopía de luz. La información fue registrada en el formato para recolección de datos (Anexo A).

Las muestras de sangre con EDTA fueron centrifugadas y el suero fue congelado para ser utilizado en el estudio serológico de detección de anticuerpos específicos anti-*Plasmodium*. Por otra parte, una alícuota (100  $\mu$ l) del sedimento de glóbulos rojos fue depositada sobre dos círculos de papel de filtro Whatman 3MM de 1 cm de diámetro que se dejaron secar durante la noche y se enviaron a la Universidad Nacional de Colombia en Bogotá para hacer el diagnóstico molecular por PCR.

Los pacientes que fueron diagnosticados como infección malárica asintomática por gota gruesa tuvieron seguimiento clínico diario y estricto y se instalaron toldillos en sus casas. De igual forma, se les administró tratamiento antimalárico específico a aquellos pacientes

que desarrollaron síntomas antes del decimocuarto día. A los pacientes que continuaron asintomáticos durante el periodo de observación se les administró el tratamiento antimalárico específico el decimocuarto día, siguiendo los esquemas oficiales para el tratamiento de la malaria en Colombia. A todos los pacientes que se mantuvieron asintomáticos durante el periodo de observación, se les practicó nuevamente gota gruesa en los días 7 y 14.

En El Cuerval, Timbiquí, no se realizó seguimiento a los pacientes que resultaron positivos para malaria. En estos casos, se les administró tratamiento antimalárico específico el mismo día en que se realizó el diagnóstico microscópico.

### **2.2.8 Examen microscópico. Gota gruesa**

Los procedimientos para la toma, preparación y coloración de la sangre siguieron los lineamientos estandarizados por el Laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Salud (INS) (Mendoza NM, et al., 2000). Las muestras de gota gruesa fueron deshemoglobinizadas con azul de metileno fosfatado y teñidas con colorantes de Field A y B, derivados de Romanowsky modificado pH 7,2. El recuento de parásitos de las muestras positivas fue realizado en 200 leucocitos; así mismo para clasificar una muestra como negativa fue necesario evaluar más de 200 campos microscópicos (Mendoza NM, et al., 2000). Las muestras de gota gruesa fueron procesadas por personal entrenado y certificado por el INS tanto en el puesto de diagnóstico de malaria en Guapi, Cauca como en El Cuerval, Timbiquí; un control de calidad fue realizado a este proceso.

### **2.2.9 Detección de parásitos del género *Plasmodium* por PCR**

Para el diagnóstico molecular de la malaria se realizó una PCR anidada empleando el kit Phusion Blood Direct PCR de Thermo Fisher Scientific (Fuehrer HP, et al., 2011) y los iniciadores descritos por Snounou G, et al., 1993 para amplificación del gen que codifica para la subunidad pequeña ribosomal 18S.

A partir de la muestra de glóbulos rojos concentrados en el papel de filtro, se obtuvo un círculo de 3 mm de diámetro que se depositó en tubos para PCR de 0,2 ml. Los glóbulos rojos fueron lisados por adición de 30 µl de agua grado molecular e incubación a 50°C durante cinco minutos, 21°C durante 15 segundos, 50°C durante 1,5 minutos y 21°C durante 15 segundos. La hemoglobina liberada en el agua fue extraída y descartada. En el mismo tubo y sobre el papel filtro se realizó la primera amplificación con 20 µl de una

mezcla de reacción que incluyó Phusion blood PCR Buffer 1X, 0,2mM de una mezcla de deoxinucleótido trifosfatos (dNTPs), 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,3µl ADN polimerasa (0,6 U/reacción) y 0,25 µM de cada iniciador (rPlu5 y rPlu6). La segunda amplificación fue una amplificación anidada multiplex para detectar *P. falciparum* y *P. vivax*, realizada en 10 µl de mezcla de reacción que contenía las mismas concentraciones de buffer, magnesio, dNTPs y enzima que la amplificación previa, pero se utilizaron los iniciadores *rfal1-rfal2-rviv1-rviv2* en una concentración de 0,25 µM cada uno; como plantilla se empleó 1 µl del producto de la primera reacción. Para la detección de *P. malariae* se utilizaron los iniciadores *rma11-rma12* y se realizó una reacción aparte. Tanto la amplificación universal como la anidada se realizaron en un primer ciclo de 5 minutos a 98°C, seguido de 35 ciclos de 98°C durante un segundo, 62°C durante 5 segundos y 72°C durante 35 segundos. Finalmente se realizó una extensión de 5 minutos a 72°C. Los productos anidados se sirvieron en geles de agarosa al 1,5% y se visualizaron en el analizador de imágenes (Syngene Sydr2/1436 Chemigenius 2 Bio Imaging System Darkroom W/Syngene Gelvue). En la Tabla 2-1 se describen los iniciadores y sus secuencias.

**Tabla 2-1:** Secuencias de los iniciadores utilizados para la detección de especies de *Plasmodium* por PCR

Detección	Amplificación	Iniciador	Secuencia
<i>Plasmodium</i> <i>sp.</i>	Primera amplificación	<i>rPlu5</i>	CTTGTTGTTGCCTTAAACTTC
	Primera amplificación	<i>rPlu6</i>	TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG
<i>P. falciparum</i>	Segunda amplificación	<i>rfal1</i>	TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT
	Segunda amplificación	<i>rfal2</i>	ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC
<i>P. vivax</i>	Segunda amplificación	<i>rviv1</i>	CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC
	Segunda amplificación	<i>rviv2</i>	ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA
<i>P. malariae</i>	Segunda amplificación	<i>rma11</i>	ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAACCGC
	Segunda amplificación	<i>rma12</i>	AAAATTCCCATGCATAAAAAATTATACAAA

## 2.2.10 Análisis estadístico

Para el análisis descriptivo univariado de las variables demográficas, antecedentes, hallazgos clínicos y pruebas de laboratorio se utilizaron herramientas numéricas convencionales (proporciones, medias, medianas, medidas de dispersión), dependiendo de si estas correspondían a variables categóricas o cuantitativas. Los estimadores se calcularon junto con los valores de *p* e intervalos de confianza al 95% (IC 95%); para las pruebas de hipótesis se usaron niveles de significación del 5%. Para todos los análisis, se utilizaron las herramientas de los programas estadísticos Stata13® y Graphpad Prisma 7®.

## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Comportamiento de la malaria en Guapi durante el periodo de estudio

Durante el periodo comprendido entre 2014 y 2017 en Colombia se presentó un promedio de 57242 casos de infección por malaria, con un rango entre 40259 y 81902. La razón entre el número de infecciones por *P. vivax* y *P. falciparum* en este mismo periodo fue cercana a 1, siendo un poco más frecuente la infección por *P. falciparum* durante los años 2015 a 2017 con porcentajes de 51,5%, 56,6% y 55,5% respectivamente. Durante el año 2016 en el país se registró un aumento de 49% en el total de casos de malaria, con un aumento de 81% en los casos de malaria complicada con respecto al año 2015; en 2016 se registraron 36 casos mortales por esta enfermedad. En el país, durante este mismo periodo, el promedio de casos de infección por *P. falciparum* fue de 31037, con un rango entre 20067 y 47228, con una tendencia al incremento de casos desde el año 2014 y un pico máximo en el año 2016 (INS, 2014–2017). Durante los cuatro años de estudio, el promedio de casos de infección por *P. falciparum* en la costa pacífica caucana fue de 1157, con un rango entre 313 y 1985; su pico máximo fue en el año 2017 y el menor número de casos ocurrió en el 2015. En Guapi, se presentaron en promedio 389 casos de infección por *P. falciparum*, con un rango entre 134 y 520 y, al igual que ocurrió en la costa pacífica caucana, el pico de casos se observó en el año 2017 y el menor número de casos en 2015. En El Cuerval hubo un aumento de casi 10 veces en el número de casos de infección por *P. falciparum* en el año 2015 con respecto al año 2014, con una reducción paulatina posterior (Datos

suministrados por la Secretaría Departamental de Salud del Cauca) (Tabla 2-2 y Figura 2-2). En la Tabla 2-2 se presentan además los índices de infección por *P. falciparum* anual (IFA), que en el caso de Guapi y El Cuerval fueron construidos usando como denominador la población registrada en las estimaciones para el año 2015 del DANE para Guapi (la totalidad de la población rural: 12.076 habitantes y 50% de la población urbana: 8.286 habitantes) y con el censo obtenido por la Secretaría Departamental de Salud del Cauca para El Cuerval (200 habitantes). Es importante anotar que de acuerdo con este índice, Guapi estaría clasificado como una zona de riesgo medio y alto para malaria y El Cuerval de riesgo alto.

**Tabla 2-2:** Distribución de casos de infección por *P. falciparum* e IFA en Colombia, el Pacífico Caucaño, Guapi y El Cuerval. 2014 – 2017 (INS, 2014–2017).

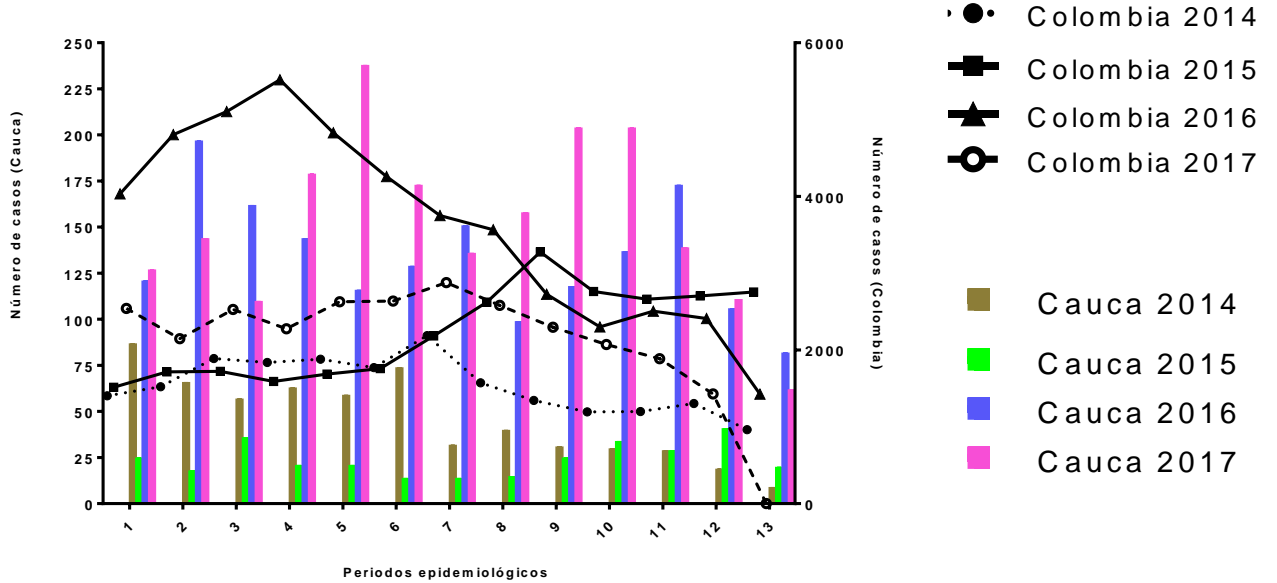
Año	Casos en Colombia	IFA	Casos en el pacífico caucaño	IFA	Casos en Guapi	IFA	Casos en El Cuerval	IFA
2014	20067	1,9	596	1,3	413	20,3	6	30
2015	28951	2,7	313	0,7	134	6,6	56	280
2016	47228	4,5	1735	3,6	488	24	19	95
2017	27902	2,7	1985	2,8	520	25,5	2	10

Fuente: Construcción propia

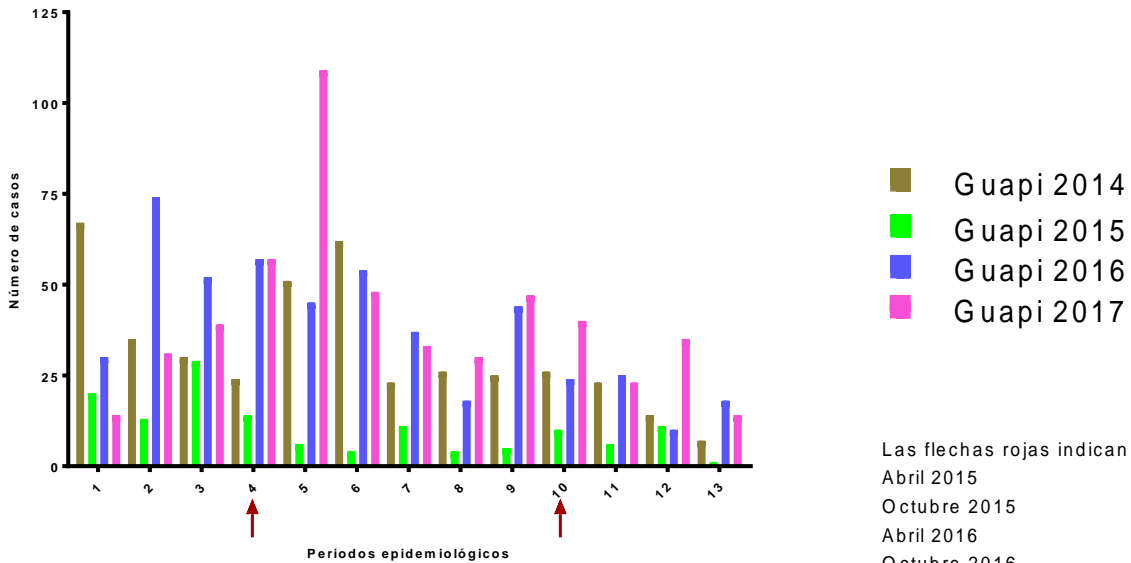
Los canales endémicos para la infección por *P. falciparum* en los municipios de Guapi y Timbiquí evidenciaron una situación de epidemia para la vigencia 2017 en la mayoría de las semanas epidemiológicas. En Guapi hubo una tendencia ascendente en las primeras semanas, hasta llegar a un pico en la semana 23, cuando se registró una media alrededor de los 76 casos, con disminución de casos hacia la semana 52 pero con dos picos más en la semana 38 y 51. En Timbiquí también hubo una tendencia ascendente las primeras semanas, con un pico inicial en la semana 7, con una media de 71 casos, posterior a lo cual hubo una reducción de casos con un nuevo pico en la semana 39 (Figura 2-3).

**Figura 2-2:** Comportamiento de la malaria en Colombia, Cauca, Guapi y El Cuerval. 2014 – 2017.

**A** Casos de malaria por *Plasmodium falciparum* en el Cauca y Colombia 2014 - 2017

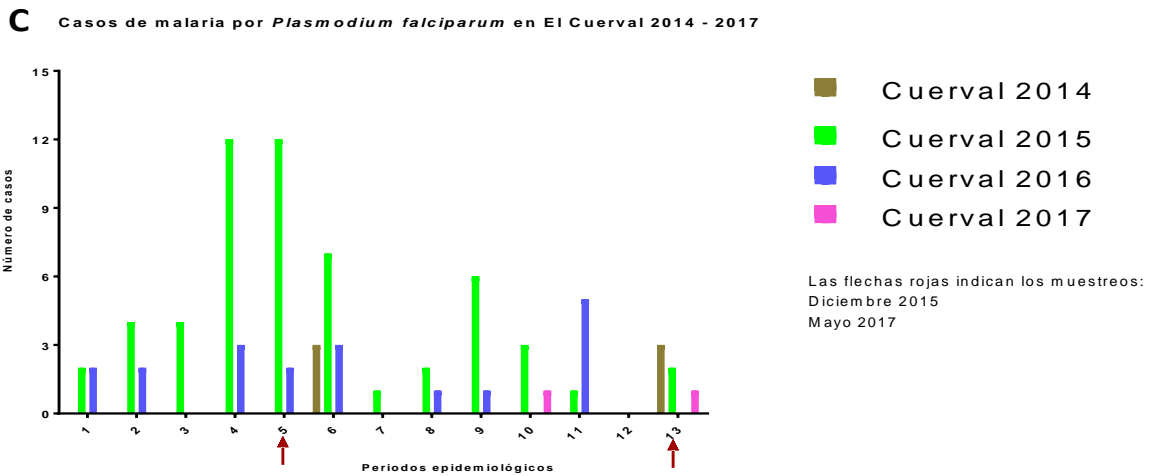


**B** Casos de malaria por *Plasmodium falciparum* en Guapi 2014 - 2017



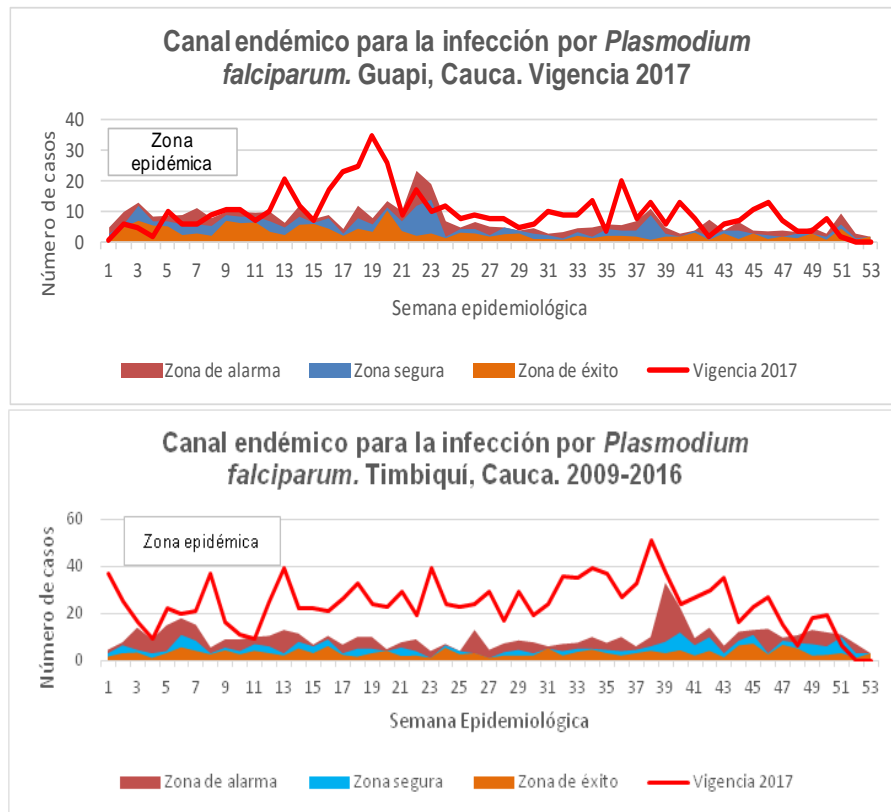
Las flechas rojas indican los muestreos:  
 Abril 2015  
 Octubre 2015  
 Abril 2016  
 Octubre 2016





A= Comportamiento de la malaria por *P. falciparum* en el departamento de Cauca (eje  $y$  izquierdo) y en Colombia (eje  $y$  derecho), para el periodo 2014-2017.  
 B= Comportamiento de la malaria por *P. falciparum* en el municipio de Guapi, para el periodo 2014-2017. Se señalan además los momentos de muestreo.  
 C= Comportamiento de la malaria por *P. falciparum* en la vereda El Cuerval, para el periodo 2014-2017. Se señalan además los momentos de muestreo.

**Figura 2-3:** Canales endémicos para la infección por *P. falciparum* por semanas epidemiológicas, Guapi y Timbiquí, Cauca. Vigencia 2017.



### **2.3.2 Malaria asintomática**

Con el fin de estimar la prevalencia de malaria asintomática usando gota gruesa y PCR se realizaron cuatro muestreos aleatorios en el barrio Santa Mónica de Guapi, en el período 2015-2016 y dos muestreos no probabilísticos (no aleatorios) en la vereda de El Cuerval en el municipio de Timbiquí, Cauca, en los años 2015 y 2017. El Cuerval es un lugar de características rurales con el cual se contrastaron los resultados obtenidos en el área urbana de Guapi. Los resultados con respecto a la malaria asintomática se presentan a continuación.

### **2.3.3 Características demográficas de la población estudiada**

Durante los seis muestreos se evaluaron en total 1368 individuos, de los cuales 50,3% (688/1368) fueron mujeres. La edad promedio del total de individuos fue de 28 años, con un rango entre 2 y 96 años. Las dos ocupaciones más frecuentes fueron ser estudiante 45,1% (617/1368) y ama de casa 15,3% (210/1368). Las frecuencias de las ocupaciones de pescador, agricultor y minero, como oficios asociados al riesgo de padecer malaria fueron 6,1% (84/1368), 2,7% (37/1368) y 1,6% (22/1368), respectivamente. Es importante destacar que en El Cuerval el oficio de pescador fue uno de los más frecuentes (23,4% y 18,4% en los dos momentos de muestreo), debido a que esta localidad es una playa ubicada sobre la bocana del río con el mismo nombre y la subsistencia de sus pobladores deriva en gran medida de la pesca. De las 1368 personas evaluadas, 35 estaban desempleadas (2,6%) y 189 (13,8%) se desempeñaban en diversas actividades informales del comercio, como vendedor en el mercado, conductor de mototaxi, vendedor de chance, entre otros. Un porcentaje de 6,2% (85/1368) manifestó estar empleado durante algunos periodos de contratación al año. La raza negra fue la más frecuente, con el 98,6% (1349/1368). El promedio de tiempo que los 1368 individuos evaluados refirieron estar viviendo en la residencia fue de 9 años con un rango entre 1 mes y 60 años. Con relación al Sistema General de Seguridad Social en Salud (SGSSS) en Colombia, de las 1368 personas evaluadas, 1100 (80,4%) pertenecían al régimen subsidiado y 100 (7,3%) al régimen contributivo. En esta región siguen existiendo individuos sin ningún tipo de afiliación (119/1368, 8,7%). Las características demográficas durante cada muestreo se resumen en la Tabla 2-3.

**Tabla 2-3:** Características demográficas de la población estudiada por muestreo. Santa Mónica y El Cuerval, Cauca. 2015- 2017.

Muestreo	A. Abril 2015. Santa Mónica (226)	B. Octubre 2015 Santa Mónica (250)	C. Abril 2016. Santa Mónica (298)	D. Octubre 2016 Santa Mónica (303)	T. Diciembre 2015 El Cuerval (188)	E. Mayo 2017 El Cuerval (103)
Mujeres (%)	110 (48,7)	127 (50,8)	152 (51)	160 (52,8)	89 (47,3)	50 (47,5)
Etnia (%) Afro-Colombiano	222 (98,2)	248 (99,2)	290 (97,3)	298 (100)	188 (100)	103 (100)
Mestiza	2 (0,9)	2 (0,8)	8 (2,7)	3 (1)	0 (0)	0 (0)
Blanco	2 (0,9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Edad promedio (rango en años)	26,5 (3 a 94)	29 (3 a 94)	28 (3 a 93)	27 (3 a 96)	27 (2 a 74)	31 (2 a 75)
Tiempo viviendo en la residencia Promedio (rango en años)	8 (0,1-40)	9 (0,1-45)	10 (0,2-9)	8 (0,1-9)	11 (0,1-9)	11 (0,1-9)
Afiliación al SGSSS (%) Contributivo	24 (10,6)	17 (6,8)	27 (9,1)	21 (6,9)	8 (4,3)	3 (2,9)
Subsidiado	176 (77,9)	202 (80,8)	246 (82,6)	244 (80,5)	148 (78,7)	84 (81,6)
Sin carnet	18 (8)	23 (9,2)	15 (5)	22 (7,3)	27 (14,4)	14 (13,6)
Ocupación (%) Estudiante	118 (52,2)	120 (48)	124 (41,6)	144 (47,5)	76 (40,4)	35 (34)
Ama de casa	22 (9,7)	42 (16,8)	52 (17,4)	39 (12,9)	31 (16,5)	24 (23,3)
Pescador	5 (2,2)	6 (2,4)	9 (3)	1 (0,3)	44 (23,4)	19 (18,4)
Minero	6 (2,7)	5 (2)	3 (1)	8 (2,6)	0 (0)	0 (0)
Agricultor	1 (0,4)	5 (2)	17 (5,7)	1 (0,3)	5 (2,7)	8 (7,8)
Otro	67 (29,6)	61 (24,4)	73 (24,5)	102 (33,7)	27 (14,4)	16 (15,5)

### 2.3.4 Antecedentes de malaria en la población estudiada

De las 1368 personas evaluadas, 676 (49,6%) dijeron haber tenido por lo menos un episodio de malaria en su vida, con un promedio de 3 y un rango de entre 1 y 30 episodios, siendo mayores las frecuencias en El Cuerval. De estas 676 personas, 260 (38,5%) afirmaron que la especie causante de su último episodio fue *P. falciparum*, 8 (1,2%) fue por *P. vivax* y 1 (0,1%) por las dos especies, es decir infección mixta; el restante porcentaje de individuos no sabía o no recordaba cual había sido la especie causante de la malaria en su último episodio. Cien (14,8%) de estos 676 individuos dijeron haber sido hospitalizados durante alguno de los episodios anteriores de malaria, lo cual permite inferir de forma indirecta acerca de posibles casos de malaria complicada. De los 676 individuos que sufrieron algún episodio de malaria, 442 (65,4%) refirieron haber consumido algún antimalárico en su último episodio y solo 38 (5,6%) recordaron el nombre del tratamiento recibido, los cuales podían ser cloroquina, primaquina, sulfadoxina/pirimetamina o la combinación artemeter/lumefantrina. Del total de individuos incluidos en el estudio, 3,8% (52/1368) informaron haber consumido antimaláricos de forma automedicada o no en las 4 semanas previas a la entrevista.

En la región es muy frecuente el uso de plantas medicinales para el tratamiento de diferentes enfermedades, por tal motivo, de las 676 personas que sufrieron algún episodio de malaria, 274 (40,5%) manifestaron haber consumido alguna bebida a base de plantas propias de la región y conocidas localmente como zapatico (*Solanum nudum*), matarratón (*Gliricidia sepium*), limón, canutillo, verdolaga, doncella, chivo, raíz de guineo, bejuco, siempreviva, linaza, malva, botoncillo, caña agria, suero de pipa, romero, sauco, flor de gallo, helecho y agua fresca.

Se sabe que el uso de toldillos impregnados con insecticidas de larga duración es una medida eficaz en la prevención de la transmisión de la malaria. Se indagó sobre el uso o no de toldillo y de los 1368 individuos, 1162 (84,9%) afirmaron usarlo de forma habitual entre una y siete noches a la semana con un promedio de 4,4 noches, siendo mayores las frecuencias encontradas durante las evaluaciones en El Cuerval comparados con las encontradas en Santa Mónica. Los hallazgos más relevantes sobre los antecedentes relacionados con malaria durante cada muestreo se consignan en la Tabla 2-4.

**Tabla 2-4:** Frecuencias de episodios anteriores de malaria y uso de toldillo en la población estudiada por muestreo. Santa Mónica y El Cuerval, Cauca. 2015- 2017.

Muestreo	A. Abril 2015. Santa Mónica (226)	B. Octubre 2015. Santa Mónica (250)	C. Abril 2016. Santa Mónica (298)	D. Octubre 2016. Santa Mónica (303)	T. Diciembre 2015. El Cuerval (188)	E. Mayo 2017 El Cuerval (103)
Malaria previa (%)	104 (46)	120 (48)	132 (44,3)	123 (40,6)	130 (69,1)	68 (66)
1 a 5 episodios	98 (43,4)	95 (38)	128 (43)	117 (38,6)	96 (51,1)	52 (50,5)
6 a 10 episodios	4 (1,8)	24 (9,6)	4 (1,3)	6 (2)	29 (15,4)	11 (10,7)
Más de 10 episodios	2 (0,9)	1 (0,4)	0 (0)	0 (0)	4 (2,1)	2 (1,9)
Uso de toldillo	202 (89,4)	199 (79,6)	231 (77,5)	244 (80,5)	187 (99,5)	99 (96,1)

### 2.3.5 Características clínicas de la población estudiada

Aunque el objetivo fue evaluar individuos asintomáticos, también se indagó sobre la presencia o no de síntomas generales, siendo los más frecuentemente informados la cefalea (350/1368, 25,6%), dolor osteomuscular (314/1368, 22,9%), dolor abdominal (252/1368, 18,4%) y fatiga o cansancio (229/1368, 16,7%). El signo clínico más frecuentemente encontrado fue palidez conjuntival (165/1368, 12,1%), seguido de palidez palmar (130/1368, 9,3%) y decaimiento (9,3%).

Las cifras de frecuencia respiratoria estuvieron en un rango entre 13 y 40, con un promedio de 22 respiraciones por minuto; las de frecuencia cardíaca entre 47 y 120, con un promedio de 78 latidos por minuto; la presión arterial sistólica entre 50 y 250, con un promedio de 110 mmHg; la diastólica entre 20 y 120, con un promedio de 73 mmHg; la temperatura entre 35 y 37,8, con un promedio de 36,3 °C y el peso entre 11 y 110 Kg con un promedio de 53,6 kilogramos.

### 2.3.6 Descripción de la infección subclínica y asintomática microscópica y submicroscópica

Del total de 1368 individuos evaluados durante los seis muestreos, 1% (13/1368) IC 95%: [0,5-1,6] fueron asintomáticos positivos por microscopía en el día 0 y 1,4% (19/1368) IC 95%: [0,8-2,2] fueron asintomáticos positivos por PCR, en el día 0. Estos datos se

presentan en la Tabla 2-5 y en las Figuras 2-4 y 2-5 se muestran dos geles como ejemplos de las PCR diagnósticas. Es importante aclarar que estos resultados incluyen aquellos individuos positivos por microscopía o PCR que eran asintomáticos al momento de inclusión en el estudio (día 0) y que desarrollaron síntomas en el transcurso de seguimiento durante los 14 días. En otras palabras, un porcentaje de individuos presentó “malaria subclínica” y desarrolló síntomas antes del día 14 de seguimiento y otro porcentaje presentó “malaria asintomática” y se mantuvo asintomático hasta el día 14 de seguimiento.

Dos individuos positivos por microscopía en el día 0 fueron negativos por PCR (uno en Santa Mónica y el otro en El Cuerval) y 8 individuos que fueron positivos por PCR fueron negativos por microscopía, es decir, fueron clasificados como malaria sub-microscópica (cuatro en Santa Mónica y cuatro en El Cuerval). No se identificaron casos de malaria asintomática ni por microscopía ni por PCR en el día 0 durante el último muestreo en El Cuerval y no se identificaron casos sub-microscópicos en el día 0 durante el cuarto muestreo en Santa Mónica. La información sobre el resultado de las pruebas utilizada para el diagnóstico se presenta en la Tabla 2-5.

Solo tres individuos del total de 1368 evaluados (0,2%) IC 95%: [0,05-0,6] se mantuvieron asintomáticos durante los 14 días de seguimiento, cumpliendo con la definición de caso de malaria asintomática establecida en la metodología; estos tres individuos fueron evaluados durante los muestreos en Santa Mónica (primero, segundo y cuarto muestreo). Los tres individuos fueron menores de edad, una mujer de 17 años y dos hombres de 9 años. Dos de ellos eran hermanos y habitantes de la misma casa. Para los tres individuos, este fue su primer episodio de malaria. Los tres individuos fueron portadores de gametocitos durante todos los momentos de seguimiento, con un promedio de 139 gametocitos/ $\mu$ l de sangre en el día 14. Cabe anotar que a los individuos evaluados en El Cuerval no se les realizó seguimiento a 14 días.

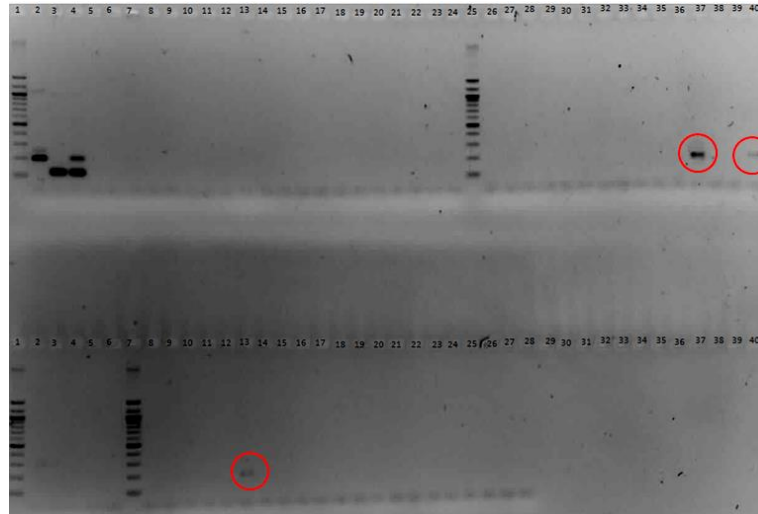
Del total de 1368 individuos evaluados durante los seis muestreos, 0,5% (7/1368) IC 95%: [0,2-1,1] fueron diagnosticados por microscopía en el día 0 como portadores de gametocitos. La parasitemia sexual (gametocitos) tuvo un rango entre 32 y 121 gametocitos/ $\mu$ l de sangre, con un promedio de 67 gametocitos/ $\mu$ l.

**Tabla 2-5:** Prevalencias de infección subclínica y asintomática por malaria diagnosticadas por microscopía y PCR e índice de correlación de estas pruebas. Santa Mónica y El Cuerval, Cauca. 2015- 2017.

	A* Abril 2015. Santa Mónica	B* Octubre 2015. Santa Mónica	C* Abril 2016 Santa Mónica	D* Octubre 2016 Santa Mónica	T* Diciembre 2015 El Cuerval	E* Mayo 2017 El Cuerval	Total
Censo	1230	815	1215	1134	200	200	4794
Individuos incluidos	226	250	298	303	188	103	1368
Positivos por PCR - día 0- (%)	6 (2,7)	3 (1,2)	2 (0,6)	1 (0,3)	7 (3,7)	0	19 (1,4)
IC 95%	0,9-5,8	0,2-3,5	0,1-2,4	0,1-1,9	1,5-7,7	0-1,2	0,8-2,2
Asintomáticos microscópicos -día 0- (%)	5 (2,2)	2 (0,8)	1 (0,3)	1 (0,3)	4 (2,1)	0	13 (1)
IC 95%	0,01-5,1	0,2-2,9	0,1-1,9	0,1-1,9	0,8-5,3	0-1,2	0,5-1,6
Asintomáticos sub- microscópicos -día 0- (%)	2 (0,9)	1 (0,4)	1 (0,3)	0	4 (2,1)	0	8 (0,6)
IC 95%	0,2-3,2	0,1-2,2	0,1-1,9	0-1,2	0,8-5,3	0-1,2	0,3-1,2
Rango parasitemia asexual	64-4114	294-5944	400	32	32 – 543	0	32-5944
Rango parasitemia sexual	0-121	0-32	40	120	0-40	0	0-121
Coefficiente Kappa	0,72	0,8	0,67	1	0,53	1	0,68

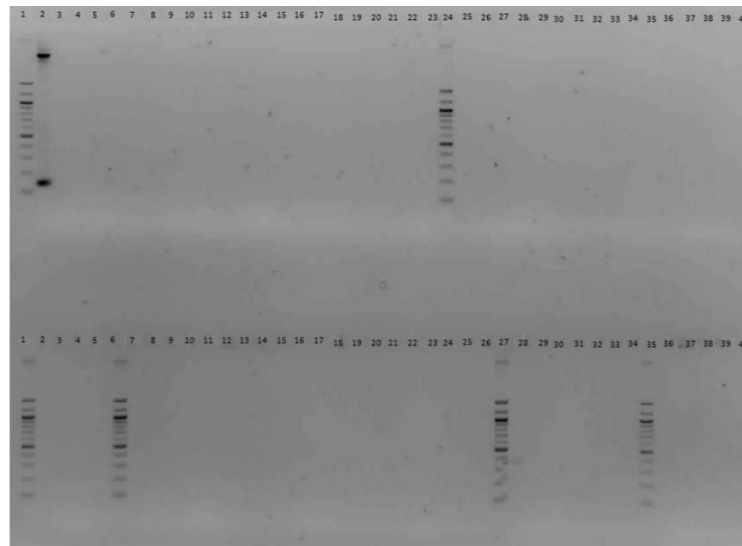
\* A, B, C y D corresponden a los muestreos aleatorios en Santa Mónica y T y E a los muestreos no probabilísticos en El Cuerval.

**Figura 2-4:** Detección de asintomáticos para *P. falciparum* y *P. vivax*. Libretas 4, 5 y 6. El Cuerval, diciembre 2015.



**Marcador de peso molecular 100pb Zymo Research:** 1, 25 (superior); 1, 7 (inferior). **Controles *P. falciparum*, *P. vivax* y *P. falciparum/P.vivax*:** 2, 3, 4 (superior). **Control negativo:** 28. **Muestras: Libreta 4:** 5-24 (superior) **Libreta 5:** 26-40 (superior), 2-6 (inferior): **Libreta 6, El Cuerval 2015:** 8-27 (inferior). Los círculos representan los casos positivos por *P. falciparum*.

**Figura 2-5:** Detección de asintomáticos para *P. malariae* libretas 11, 12, 13, 14,15. Santa Mónica, octubre 2015.



**Marcador de peso molecular 100 pb Zymo Research:** 1, 24 (superior) y 1, 6, 27, 35 (inferior). **Control positivo ADN plasmídico con el inserto para detección de la subunidad 18S del gen ribosomal de *P. malariae* (144pb):** 2 (superior). **Control negativo:** 23 (superior), 40 (inferior). **Muestras: Libreta 11:** 3-22 (superior). **Libreta 12:** 25-40 (superior), 2-5 (inferior). **Libreta 13:** 7-26 (inferior). **Libreta 14:** 36-39 (inferior). **Libreta 15:** (28-34 (inferior).



Se identificó diferencia estadísticamente significativa entre las proporciones de diagnóstico por PCR ( $p= 0,009$ , con 95% de confianza,) obtenidas en los diferentes muestreos en el día 0. Para el resto de estimadores el valor de  $p$  estuvo entre 0,053 y 0,073, lo cual significa que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las proporciones obtenidas durante los diferentes muestreos para el diagnóstico de malaria subclínica y asintomática microscópica y submicroscópica en el día 0. Cabe la pena destacar que las observaciones menos homogéneas, causantes de las diferencias entre proporciones son las obtenidas en los muestreos realizados en El Cuerval.

De los pacientes con malaria subclínica y asintomática identificados por microscopía en el día 0, 61,5% (8/13) eran hombres, con un promedio de edad de 16 años (rango entre 8 y 42), todos de raza negra, tres de ellos (23,1%) sin afiliación al Sistema General de Seguridad Social en Salud en Colombia y los demás (10/13, 76,9%) pertenecientes al Régimen Subsidiado. Uno de ellos era pescador, otra era ama de casa, dos de ellos se dedicaban a oficios varios y nueve (69,2%) eran estudiantes. Siete (53,9%) de ellos refirieron estar viviendo en la región hace menos de 5 años. Solo uno no utilizaba toldillo en la noche. Cinco de ellos (38,5%) refirieron haber tenido malaria previamente y para el resto, el diagnóstico realizado durante este estudio fue su primer episodio. Los cuatro pacientes diagnosticados en El Cuerval habían presentado episodios de malaria previamente. Al igual que en la población seleccionada en la muestra, el síntoma más frecuente que refirieron fue la cefalea (5/13, 38,5%) y los signos más frecuentemente identificados en 4 de los 13 pacientes (30,8%) fueron palidez conjuntival y palidez palmar.

De los ocho pacientes con infección subclínica y asintomática y que fueron submicroscopicos en el día 0, 62,5% (5/8) eran hombres y con un promedio de edad de 40 años (rango entre 7 y 76). El 87,5% (7/8) eran de raza negra, seis de los ocho (75%) pertenecientes al Régimen Subsidiado del Sistema General de Seguridad Social en Salud en Colombia y 25% (2/8) pertenecientes al Régimen Contributivo. Cuatro (50%) se dedicaban a oficios varios y los otros cuatro (50%) eran estudiantes. Cuatro (50%) refirieron estar viviendo en la región hace más de 5 años. Solo uno no utilizaba toldillo en la noche. Seis de ellos (75%) refirieron haber tenido malaria previamente y para los demás el diagnóstico realizado durante el desarrollo del estudio fue su primer episodio. Los cuatro pacientes diagnosticados en El Cuerval habían presentado episodios de malaria previamente. El síntoma más frecuente referido fue el dolor osteomuscular y el

dolor abdominal con una frecuencia de 37,5% (3/8) para cada uno de estos síntomas; los signos más frecuentemente identificados fueron decaimiento, palidez conjuntival y palidez palmar con una frecuencia de 12,5% (1/8).

Las características demográficas, clínicas y parasitológicas de los individuos con infección subclínica y asintomática microscópica y sub-microscópica se resumen en las Tablas 2-6 y 2-7.

**Tabla 2-6:** Características parasitológicas, de diagnóstico molecular, demográficas y antecedentes de los individuos con infección subclínica y asintomática por malaria diagnosticados por microscopía y PCR en el día 0. Santa Mónica y El Cuerval, Cauca. 2015- 2017.

Muestreo	A. Abril 2015 Santa Mónica (226)	B. Octubre 2015 Santa Mónica (250)	C. Abril 2016 Santa Mónica (298)	D. Octubre 2016 Santa Mónica (303)	T. Diciembre 2015 El Cuerval (188)	E. Mayo 2017 El Cuerval (103)	Total
Diagnóstico por microscopía. Día 0	5	2	1	1	4	0	13
Diagnóstico por PCR. Día 0	4	2	1	1	3	0	11
Rango parasitemia asexual. Día 0	64-4114	294-5944	400	48	32-543	0	32-5944
Rango parasitemia sexual. Día 0	0-121	0-32	40	96	0-40	0	0-121
Mujeres	3	0	1	0	1	0	5
Hombres	2	2	0	1	3	0	8
Etnia Afro-Colombiano	5	2	1	1	4	0	13
Edad (años)							
2 a 14	0	1	0	1	3	0	5
15 a 45	5	1	1	0	1	0	8
Mayor de 45	0	0	0	0	0	0	0
Residencia (años)							
>1 a 5	4	0	1	0	2	0	7
6 a 10	1	1	0	1	1	0	4
Mayor a 10	0	1	0	0	1	0	2
Afiliación al SGSSS							
Subsidiado	4	2	1	1	2	0	10
Sin carnet	1	0	0	0	2	0	3
Ocupación							
Estudiante	5	1	0	1	2	0	9
Ama de casa	0	0	1	0	0	0	1
Pescador	0	0	0	0	1	0	1
Otro	0	1	0	0	1	0	2

**Tabla 2-6:** (Continuación)

Muestreo	A. Abril 2015 Santa Mónica (226)	B. Octubre 2015 Santa Mónica (250)	C. Abril 2016 Santa Mónica (298)	D. Octubre 2016 Santa Mónica (303)	T. Diciembre 2015 El Cuerval (188)	E. Mayo 2017 El Cuerval (103)	Total
Malaria previa							
0 episodios	0	0	0	0	0	0	0
1 a 5 episodios	1	0	0	0	3	0	4
6 a 10 episodios	0	0	0	0	1	0	1
>10 episodios	0	0	0	0	0	0	0
Uso de toldillo							
Sí	5	2	1	0	4	0	12
No	0	0	0	1	0	0	1

**Tabla 2-7:** Características parasitológicas, de diagnóstico molecular, demográficas y antecedentes de los individuos con infección subclínica y asintomática por malaria diagnosticados por PCR (infección sub-microscópica). Santa Mónica y El Cuerval, Cauca. 2015- 2017.

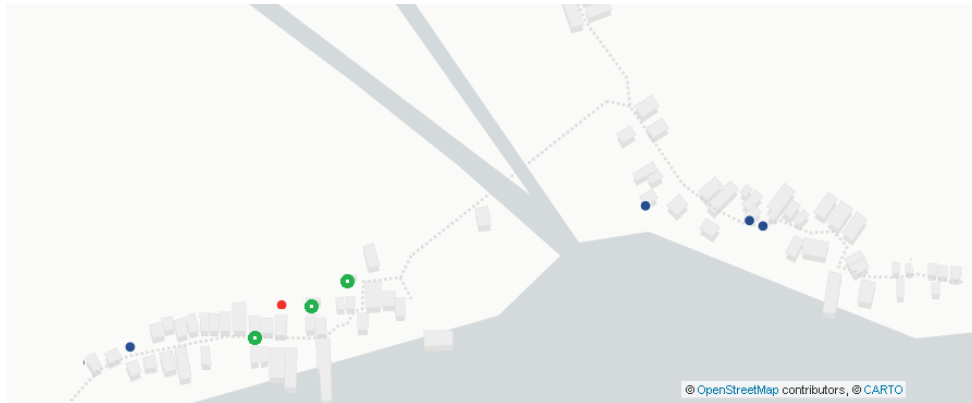
Muestreo	A. Abril 2015. Santa Mónica (226)	B. Octubre 2015. Santa Mónica (250)	C. Abril 2016. Santa Mónica (298)	D. Octubre 2016. Santa Mónica (303)	T. Diciembre 2015. El Cuerval (188)	E. Mayo 2017. El Cuerval (103)	Total
Diagnóstico por PCR. Día 0	2	1	1	0	4	0	8
Diagnóstico por microscopia. Día 0	0	0	0	0	0	0	0
Mujeres	1	0	0	0	2	0	3
Hombres	1	1	1	0	2	0	5
Etnia							
Afro-Colombiano	2	1	0	0	4	0	7
Mestizo	0	0	1	0	0	0	1
Edad (años)							
2 a 14	0	0	0	0	1	0	1
15 a 45	1	0	0	0	2	0	3
Mayor de 45	1	1	1	0	1	0	4
Residencia (años)							
>1 a 5	1	0	1	0	0	0	2
6 a 10	0	0	0	0	2	0	2
Mayor a 10	1	1	0	0	2	0	4
Afiliación al SGSSS							
Contributivo	0	1	0	0	1	0	2
Subsidiado	2	0	1	0	3	0	6
Ocupación							
Estudiante	1	0	0	0	3	0	4
Otro	1	1	1	0	1	0	4

**Tabla 2-7:** (Continuación)

Muestreo	A. Abril 2015. Santa Mónica (226)	B. Octubre 2015. Santa Mónica (250)	C. Abril 2016. Santa Mónica (298)	D. Octubre 2016. Santa Mónica (303)	T. Diciembre 2015. El Cuerval (188)	E. Mayo 2017. El Cuerval (103)	Total
Malaria previa							
0 episodios	1	0	1	0	0	0	2
1 a 5 episodios	1	1	0	0	2	0	4
6 a 10 episodios	0	0	0	0	1	0	1
>10 episodios	0	0	0	0	1	0	1
Uso de toldillo							
Sí	1	1	1	0	4	0	7
No	1	0	0	0	0	0	1

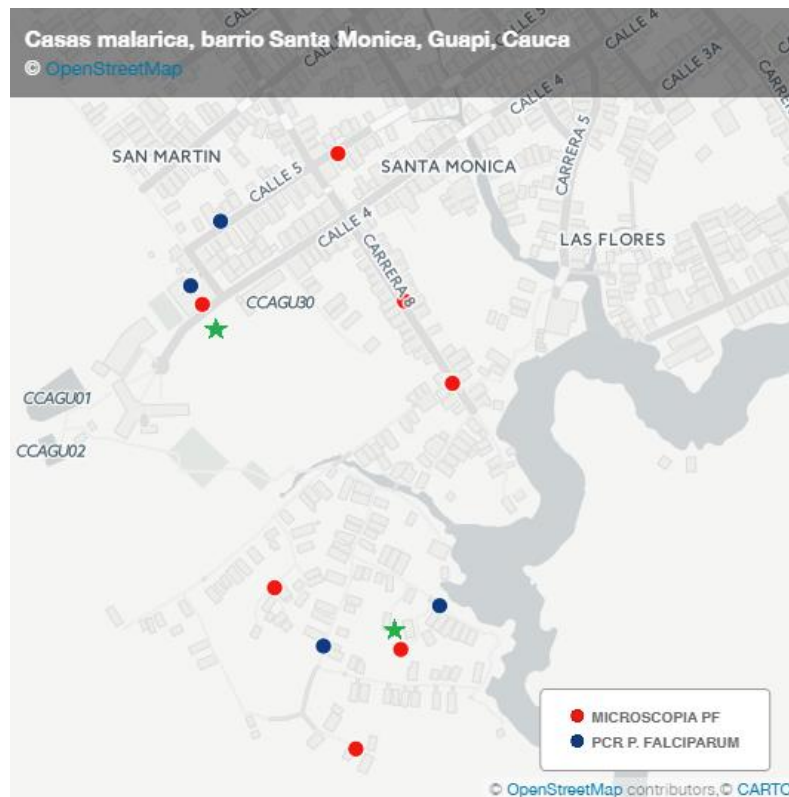
Se logró determinar la distribución geográfica específica de los casos de infección subclínica y asintomática diagnosticados en el día 0, tanto en el barrio Santa Mónica en Guapi, como en El Cuerval, Timbiquí; particularmente para este último lugar, los casos de infección subclínica y asintomática microscópica se ubicaron en una de las dos playas de la localidad, de la cual se reportan con mayor frecuencia los casos de malaria en el registro rutinario de la Secretaría de Salud Departamental del Cauca. Por otro lado, las residencias de los casos de malaria subclínica y asintomática positivos por microscopía o por PCR en el barrio Santa Mónica, Guapi (con excepción de dos casos procedentes de las casas 210 y 245), estaban ubicadas en el sector de la “L” del que tradicionalmente se informan la mayoría de pacientes con malaria en el registro rutinario de la Secretaría de Salud Departamental del Cauca; es importante destacar que en este sector está ubicado tanto el Hogar Mónica para personas de la tercera edad y el Jardín Infantil y al cual pertenece un cuerpo de agua (lago) positivo para criaderos de anofelinos y que fue intervenido en el pasado como parte de las actividades del Programa para el Control de las Enfermedades Transmitidas por Vectores (Figuras 2-6 y 2-7).

**Figura 2-6.** Ubicación geográfica de los casos de malaria subclínica y asintomática en El Cuerval, Timbiquí, Cauca. 2015 y 2017.



En color rojo se señala el caso diagnosticado por microscopia (PCR negativo), en azul los positivos por PCR (sub-microscópicos) y en verde los positivos por las dos técnicas.

**Figura 2-7.** Ubicación geográfica de los casos de malaria subclínica y asintomática en el barrio Santa Mónica, Guapi, Cauca. 2015 y 2016.



En color rojo se señalan los casos diagnosticados por microscopia, en azul los positivos por PCR (sub-microscópicos) y la estrella verde indica que en la misma casa hubo dos casos diagnosticados por microscopia.

## 2.4 Discusión

Durante la vigilancia de la infección asintomática por *Plasmodium spp.* en el barrio Santa Mónica en Guapi en los años 2015 y 2016 y en El Cuerval en los años 2015 y 2017 se detectó infección por *P. falciparum* lo cual constituye sin lugar a dudas un reservorio humano de la infección (Bousema T, et al., 2014).

En Santa Mónica, Guapi, se evidenció una tendencia a la disminución en la proporción de casos subclínicos y asintomáticos de *P. falciparum* detectados tanto por microscopía (2,2 a 0,3%) como por PCR (2,7 a 0,3%) en el día 0, existiendo diferencias estadísticamente significativas en las proporciones de infecciones subclínicas y asintomáticas detectadas por PCR durante los seis muestreos, incluyendo los de El Cuerval. Esto contrasta con el comportamiento de la malaria en el municipio durante el mismo periodo, tiempo durante el cual se evidenció un aumento progresivo de casos de infección por *P. falciparum* desde el año 2015 hasta 2017.

En El Cuerval en los años 2015 y 2017, también se evidenció una tendencia a la disminución en la proporción de casos subclínicos y asintomáticos de *P. falciparum* detectados tanto por microscopía (2,1 a 0%) como por PCR (3,7 a 0%) en donde también existieron diferencias estadísticamente significativas en las proporciones por PCR como se mencionó anteriormente; sin embargo, los casos de infección por *P. falciparum* en este lugar disminuyeron entre 2015 y 2017, aunque con cifras de IFA extremadamente elevadas (280 para 2015 y 10 para 2017).

Existe una correlación positiva entre zonas de alta transmisión para malaria y las altas prevalencias de infección asintomática (Laishram DD, et al., 2012); en zonas en donde la malaria es estacional, como en Senegal, durante la época de sequía en la cual la proporción de malaria clínica disminuye, la prevalencia de infección asintomática en esta misma época aumenta, asegurando el mantenimiento de la infección durante todo el año y constituyendo el principal reservorio en ausencia de transmisión (Males S, et al., 2008); en contraste con este último estudio, en otro informe realizado en las poblaciones de Dielmo y Ndiop, también en Senegal y consideradas zonas de baja transmisión, se concluye que es posible que la prevalencia de infección asintomática y sub-microscópica no esté relacionada con la intensidad de la transmisión, aunque resalta la importante

contribución de las bajas prevalencias de infección sub-microscópica en el mantenimiento de la malaria en la región (Niang M, et al., 2017).

La dinámica de transmisión de la malaria es un evento complejo y variable el cual depende de factores climáticos, del comportamiento del vector y la ubicación de los sitios de criaderos, de la presencia de conglomerados humanos con población susceptible, de la movilidad humana y de la presencia de reservorio tanto humano como artrópodo, entre otros factores (Laishram DD, et al., 2012). Al analizar las prevalencias de infección subclínica y asintomática en El Cuerval a la luz del comportamiento epidemiológico de la malaria a nivel local, estas estarían en correlación positiva con el comportamiento de la malaria en el mismo periodo de tiempo, pues coincide la disminución de casos informados al sistema de vigilancia epidemiológica con la disminución en la prevalencia de la infección subclínica y asintomática encontrada en el presente estudio. En contraste, en Guapi ocurre lo contrario, la disminución en la proporción de casos de infección subclínica y asintomática se relaciona con el aumento de casos informados al sistema de vigilancia epidemiológica. Es importante destacar que en Guapi se detectó una fluctuación en el número de individuos residentes en Santa Mónica durante los censos realizados; además, durante el estudio de caso de cada individuo con malaria subclínica y asintomática, se estableció que un buen número de los diagnosticados por PCR no se pudieron volver a contactar en Guapi, pues habían cambiado su residencia a otros lugares cercanos con transmisión o no de malaria, lo cual hacía bastante difícil definir si el caso de malaria subclínica o asintomática era “autóctono” o no del barrio Santa Mónica. Por otra parte, El Cuerval es una localidad con alta movilidad humana secundaria dependiente de la actividad económica de los habitantes, lo cual también dificulta el seguimiento de los casos de malaria. Es muy importante enfatizar que los 3 casos que se mantuvieron asintomáticos y positivos por microscopia hasta el día 14, residían de forma permanente en casas vecinas del barrio Santa Mónica, las cuales pertenecían al sector de la “L” en donde tradicionalmente se identifican los casos sintomáticos en este barrio y que ha representado un problema para el control de la malaria en Guapi.

El seguimiento clínico y parasitológico de los pacientes en Santa Mónica, Guapi, permitió descartar algunos casos que posiblemente se encontraban en periodo de incubación para malaria o cursaban con otras patologías como síndrome febril asociado a infección por Chikunguña que presentó un pico epidémico en la región y en el país en general

durante el año 2015 (INS, 2016(a)) y que coincidió con el primer momento de muestreo en abril del mismo año. Particularmente, los tres pacientes que se mantuvieron positivos hasta el día 14 eran menores de 17 años, residentes en casas vecinas, con presencia de gametocitos y con promedios de niveles de parasitemia asexual inferior a 700 parásitos/ $\mu$ l que disminuyeron durante el seguimiento, lo cual se ha descrito también en otros estudios (Branch O, et al., 2005). Aunque son pocos casos, el perfil de los pacientes asintomáticos los circunscribe a una zona geográfica determinada, con potencial de transmisión debido a la presencia de gametocitos y posiblemente relacionado con un genotipo particular del parásito, ya que se sabe que algunas cepas de *P. falciparum* están asociados con la posibilidad de desarrollar síntomas en el humano y estimular la producción de gametocitos (Franks S, et al., 2001; Amodu OK, et al., 2005; Berezky S, et al., 2007).

La adquisición de inmunidad en malaria depende de la exposición repetida a la infección y de la edad (Greenwood BM, 1987; Artavanis-Tsakonas K, et al., 2003; White NJ, et al., 2014). En zonas de baja transmisión la inmunidad parcialmente protectora en malaria se evidencia en la edad adulta y esta puede estar asociada a la presencia de infección asintomática (Laishram DD, et al., 2012); esto contrasta con las edades de los pacientes con infección subclínica y asintomática identificados en este estudio, principalmente los tres individuos que se mantuvieron negativos al día 14, quienes eran menores de 17 años, aunque es importante destacar que 7 de los 8 individuos con infección sub-microscópica eran mayores de 15 años, lo cual podría significar diferencias entre la infección asintomática microscópica y sub-microscópica diagnosticadas en el día 0 en la región.

La especie detectada en los dos lugares, tanto por PCR como por microscopía fue *P. falciparum*, lo cual coincide con la especie más frecuentemente informada para malaria en la Región Pacífica colombiana (Rodríguez JC, et al., 2011).

En Suramérica, incluyendo Colombia, las infecciones asintomáticas por *P. falciparum* reportan un rango de prevalencias amplio entre 0 y 38,5% (Alves FP, et al., 2002; Marcano TJ, et al., 2004; Cerutti C Jr, et al., 2007; Fugikaha E, et al., 2007; Tada MS, et al., 2007; Suárez-Mutis MC, et al., 2007; Roper MH, et al., 2000; Roshanravan B, et al., 2003; Branch O, et al., 2005; Cucunubá ZM, et al., 2008; Cucunubá ZM, et al., 2013; Osorio L, et al., 2004), lo cual es producto de la gran variabilidad en los diseños de los



estudios, la metodología de la selección de la muestra, la prueba de diagnóstico empleada y el comportamiento epidemiológico de la malaria en cada región. Particularmente en Colombia las prevalencias de infección asintomática por malaria están entre 0 y 16,5% (Osorio L, et al., 2004; Cucunubá ZM, et al., 2008; Cucunubá ZM, et al., 2013; Vásquez-Jiménez JM, et al., 2016; Vallejo AF, et al., 2015). El presente estudio informó una de las más bajas prevalencias de infección subclínica y asintomática por malaria en el país, particularmente para Guapi, una zona de riesgo moderado (IFA menor a 10 en el año 2015) y alto (IFA mayor a 10 en los años 2014, 2016 y 2017) y en un contexto de riesgo alto de acuerdo con el IFA mayor a 10 registrado en El Cuerval durante el periodo 2014 - 2017. En Colombia se han realizado estudios en zonas eco-epidemiológicas diferentes, como el bosque húmedo y seco tropical en Tierralta en el Bajo Cauca-Alto Sinú (Cucunubá ZM, et al., 2008; Cucunubá ZM, et al., 2013; Vásquez-Jiménez JM, et al., 2016; Vallejo AF, et al., 2015), región de alto riesgo para malaria, con mayor proporción de casos de infección por *P. vivax* y en Tumaco, Quibdó y Buenaventura en el bosque muy húmedo tropical en el Pacífico (Vásquez-Jiménez JM, et al., 2016; Vallejo AF, et al., 2015; Cucunubá ZM, et al., 2013), la cual también es una zona de alta transmisión para malaria, pero con mayor prevalencia de infecciones por *P. falciparum* y a la que pertenece Guapi y El Cuerval. La metodología de selección de la muestra fue diferente, pues en algunos casos la selección fue aleatoria, como la realizada en el presente estudio o a partir de la búsqueda de individuos posterior a la selección aleatoria de la vivienda, como en el estudio realizado por Vásquez-Jiménez JM y colaboradores en 2016. En todos estos estudios, la PCR o la qPCR son las pruebas con mayor rendimiento para el diagnóstico de la infección asintomática y aunque se ha informado que ocasionalmente la PCR puede tener falsos negativos (Barker RH Jr, et al., 1994), como posiblemente ocurrió en el presente estudio con dos muestras, una en Guapi y otra en El Cuerval, que fueron positivas por microscopía pero negativas por PCR, esta última prueba presenta mayor sensibilidad y especificidad comparada con la microscopía o las pruebas de diagnóstico rápido (Bousema T, et al., 2014).

A pesar de las diferencias metodológicas encontradas en los diferentes estudios, es claro que la infección asintomática está presente en las zonas de mayor riesgo de transmisión en Colombia, y que representa el reservorio humano de la infección y sus características están en estrecha relación con las características y la dinámica de transmisión local de la malaria en el país.

Aunque en este estudio no se llevó a cabo una evaluación entomológica, la distribución de casos de infección subclínica y asintomática están bastante bien delimitadas en la zona conocida como la “L” en el barrio Santa Mónica, como se mencionó anteriormente y en una de las dos playas que conforman El Cuerval, lugares donde tradicionalmente el Programa de Malaria de la Secretaría Departamental de Salud del Cauca ha reportado la mayoría de los casos sintomáticos. Estudios entomológicos previos realizados por la Secretaría Departamental de Salud del Cauca caracterizaron dos lagos ubicados en el Hogar Mónica colindantes con la zona de la “L” en los que se identificaron especies de *Anopheles albmanus* (96,8 %), *Anopheles apicimacula* (2,7 %) y *Anopheles neivai* (0,6%) (Datos suministrados por la Secretaría Departamental de Salud del Cauca). Estos lagos fueron intervenidos en el año 2007, lo cual contribuyó en gran medida a la disminución de casos de malaria en Guapi.

En este estudio se observó que la mayoría de los individuos están afiliados al régimen subsidiado (80,4%) del SGSSS, lo cual indica de forma indirecta el nivel económico de los participantes y se traduce en un alto porcentaje de pobladores con bajo nivel adquisitivo, que además está en relación con el porcentaje de informalidad laboral o desempleo superior a 15%. De igual forma, se evidencian fallas en el sistema de salud, debido a la falta de aseguramiento de individuos que se encontraron sin ningún tipo de afiliación al sistema de salud (8,2%), aspecto que se traduce en mayor marginación y limitado acceso al servicio de salud.

Llama la atención el alto porcentaje (49,6%) de individuos que dijeron haber tenido por lo menos un episodio de malaria previo, lo cual se traduce en alto nivel de exposición a la infección y posible desarrollo de inmunidad parcialmente protectora. Algunos de ellos fueron hospitalizados durante alguno de estos episodios, lo cual indica de forma indirecta la presencia de posibles casos de malaria complicada. Así mismo, es interesante observar la alta frecuencia (40,5%) de consumo de alguna bebida a base de plantas propias de la región como parte del manejo terapéutico empírico de la malaria. Algunos individuos informaron haber consumido antimaláricos de forma automedicada o no en las 4 semanas previas a la entrevista (3,8%) y aunque es un porcentaje bajo, está relacionado con la presión de selección a los antimaláricos que contribuye al desarrollo de resistencia a estos medicamentos (Haldar K, et al., 2018).

Existe una alta frecuencia (84,9%) de pobladores que usaban de forma habitual el toldillo, entre una y siete noches a la semana con un promedio de 4,4 noches, siendo mayores estas frecuencias en El Cuerval, lo cual permite inferir que la población reconoce esta estrategia como herramienta eficaz para la prevención de la malaria (White NJ, et al., 2014), aunque existe alrededor del 15% de pobladores que deben ser blanco de programas de educación y reconocimiento de actividades que limiten la exposición a la picadura del vector y disminuyan la transmisión.

Se identificó una alta proporción de individuos que refirieron presentar síntomas generales constitucionales como cefalea (350/1368, 25,6%), dolor osteomuscular (314/1368, 22,9%), dolor abdominal (252/1368, 18,4%) y fatiga o cansancio (229/1368, 16,7%), los cuales se pueden presentar en casos de infección malárica pero no son específicos ni patognomónicos sino que pueden estar asociados a un grupo amplio de patologías infecciosas o no. Guapi presenta graves problemas en la situación de salud, como lo demuestran algunos indicadores tales como las altas tasas de mortalidad infantil (37 por 1000 nacidos vivos, una de las mayores en el departamento y en la Región Pacífica), bajas coberturas de servicios de electricidad, acueducto y alcantarillado (48,5, 17,2, 16,1 respectivamente) y altos niveles de desplazamiento por condiciones económicas o por orden público (Consejo Noruego para los Refugiados, 2016; Ministerio de Salud y Protección Social, Secretaria Departamental de Salud del Cauca, 2013; Concejo Municipal de Guapi, Departamento del Cauca, 2015). La precaria situación de salud evidenciada durante el desarrollo del trabajo fue realmente preocupante. La Empresa Social del Estado de Guapi se encontró en un déficit financiero, principalmente relacionado con los pagos pendientes por las entidades aseguradoras del sistema, situación que limitaba gravemente la calidad de atención al usuario. La ubicación geográfica del municipio y el alto porcentaje de población en el sector rural incrementan los costos de la prestación de servicios, lo cual es evidente al momento de ser requerido un traslado de un paciente a un nivel de mayor complejidad de atención en Cali o Popayán, que implica además de los costos, la logística del transporte que depende, entre otros factores, de las condiciones climáticas. Durante el tiempo de desarrollo del trabajo se presentó un brote de Chikunguña y se identificaron casos de leptospirosis, uno de ellos con desenlace fatal, además de un grave problema de recolección de residuos sólidos, todo lo cual pone en alerta sobre el riesgo ambiental de transmisión de

enfermedades con un nicho ecológico favorecido por las precarias condiciones de vida y el deterioro del medio ambiente que se evidencia en el municipio.

Durante la recolección de la información se presentó el sesgo de memoria, como es habitual en el desarrollo de estudios que incluyen encuestas, lo cual podría alterar el contenido de las respuestas a las preguntas realizadas durante la inclusión de los individuos. Otras limitaciones del estudio incluyen la dificultad en el análisis estadístico de los individuos asintomáticos, debido al bajo número de casos identificados. Además, no se logró realizar el contraste de los seguimientos clínicos y parasitológico, debido a la dificultad de realizar este procedimiento en El Cuerval.

En la misma línea de las limitaciones del estudio y debido a la dificultad para conservar el ARN parasitario, únicamente se tuvieron en cuenta los valores de gametocitos de las infecciones subclínicas y asintomáticas microscópicas para el análisis, a pesar de que en ningún momento se pretendió realizar un estudio de transmisibilidad humano-vector.

## Referencias

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;66:641–648.

Amodu OK, Adeyemo AA, Ayoola OO, Gbadegesin RA, Orimadegun AE, Akinsola AK, Olumese PE, Omotade OO. Genetic diversity of the msp-1 locus and symptomatic malaria in south-west Nigeria. *Acta Trop.* 2005 Sep;95(3):226-32

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 Aug;133(2):145-52;

Barker RH Jr, Banchongaksorn T, Courval JM, Suwonkerd W, Rimwungtragoon K, Wirth DF. *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*: factors affecting sensitivity and specificity of PCR-based diagnosis of malaria. *Exp Parasitol*. 1994 Aug;79(1):41-9.

Bereczky S, Liljander A, Rooth I, Faraja L, Granath F, Montgomery SM, Färnert A. Multiclonal asymptomatic *Plasmodium falciparum* infections predict a reduced risk of malaria disease in a Tanzanian population. *Microbes Infect*. 2007 Jan;9(1):103-10. Epub 2006 Dec 6

Bousema T, Okell L, Felger I, Drakeley C. Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. *Nat Rev Microbiol*. 2014 Dec;12(12):833-40. doi: 10.1038/nrmicro3364. Epub 2014 Oct 20. Review

Branch O, Casapia WM, Gamboa DV, Hernandez JN, Alava FF, Roncal N, Alvarez E, Perez EJ, Gotuzzo E. Clustered local transmission and asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria infections in a recently emerged, hypoendemic Peruvian Amazon community. *Malar J*. 2005;4:27.

Cerutti C Jr, Boulos M, Coutinho AF, HatabMdo C, Falqueto A, Rezende HR, Duarte AM, Collins W, Malafronte RS: Epidemiologic aspects of the malaria transmission cycle in an area of very low incidence in Brazil. *Malar J*. 2007;6:33.

Concejo Municipal de Guapi, Departamento del Cauca. Plan de Desarrollo Municipal 2012-2015.

Consejo Noruego para los Refugiados. Informe Final MIRA: Consejos Comunitarios Alto Guapi y San Francisco, Guapi (Cauca). Situación de afectación por conflicto Consejos comunitarios Alto Guapi y San Francisco, 2016. Disponible en: [https://www.humanitarianresponse.info/sites/www.humanitarianresponse.info/files/assessments/160712\\_informe\\_final\\_mira\\_guapi.pdf](https://www.humanitarianresponse.info/sites/www.humanitarianresponse.info/files/assessments/160712_informe_final_mira_guapi.pdf).

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 Feb;107(2):129-36. doi: 10.1093/trstmh/trs021. Epub 2012 Dec 2.

Cucunubá ZM, Guerra AP, Rahirant SJ, Rivera JA, Cortés LJ, Nicholls RS. Asymptomatic *Plasmodium* spp. infection in Tierralta, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008 Nov;103(7):668-73.

Dennis RJ y Pérez A. Cálculo del tamaño de muestra. En: Ruiz A y Morillo LE. Epidemiología clínica: investigación clínica aplicada. Ed. Médica Panamericana, 2004.

Franks S, Koram KA, Wagner GE, Tetteh K, McGuinness D, Wheeler JG, Nkrumah F, Ranford-Cartwright L, Riley EM. Frequent and persistent, asymptomatic *Plasmodium falciparum* infections in African infants, characterized by multilocus genotyping. *J Infect Dis*. 2001 Mar 1;183(5):796-804. Epub 2001 Feb 8

Fuehrer HP, Fally MA, Habler VE, Starzengruber P, Swoboda P, Noedl H. Novel nested direct PCR technique for malaria diagnosis using filter paper samples. *J Clin Microbiol*. 2011 Apr;49(4):1628-30. doi: 10.1128/JCM.01792-10. Epub 2011 Jan 26.

Fugikaha E, Fornazari PA, Penhalbel Rde S, Lorenzetti A, Maroso RD, Amoras JT, Saraiva AS, Silva RU, Bonini-Domingos CR, Mattos LC, Rossit AR, Cavasini CE, Machado RL: Molecular screening of *Plasmodium* spp. Asymptomatic carriers among transfusion centers from Brazilian Amazon region. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2007;49:1-4.

Gil LH, Tada MS, Katsuragawa TH, Ribolla PE, da Silva LH: Urban and suburban malaria in Rondônia (Brazilian Western Amazon) II. Perennial transmissions with high anopheline densities are associated with human environmental changes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102:271-276.

Greenwood BM1. Asymptomatic malaria infections--do they matter?. *Parasitol Today*. 1987 Jul;3(7):206-14;

Haldar K, Bhattacharjee S, Safeukui I. Drug resistance in *Plasmodium*. *Nat Rev Microbiol*. 2018 Mar;16(3):156-170. doi: 10.1038/nrmicro.2017.161. Epub 2018 Jan 22. Review.

Instituto Nacional de Salud (INS)–Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública. Informe final malaria, Colombia, 2014.

Instituto Nacional de Salud (INS)–Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública. Informe final del evento malaria, Colombia, 2015.

Instituto Nacional de Salud (INS)–Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública. Informe final del evento malaria, Colombia, 2016.

Instituto Nacional de Salud (INS)–Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública. Informe del evento malaria, hasta el periodo epidemiológico XIII, Colombia, 2017.

Instituto Nacional de Salud–Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública. Boletín epidemiológico semanal. Número 52 de 2016.(a).

Laishram DD, Sutton PL, Nanda N, Sharma VL, Sobti RC, Carlton JM, Joshi H. The complexities of malaria disease manifestations with a focus on asymptomatic malaria. *Malar J*. 2012 Jan 31;11:29. doi: 10.1186/1475-2875-11-29

Males S, Gaye O, Garcia A. Long-term asymptomatic carriage of *Plasmodium falciparum* protects from malaria attacks: a prospective study among Senegalese children. *Clin Infect Dis*. 2008 Feb 15;46(4):516-22. doi: 10.1086/526529.

Marcano TJ, Morgado A, Tosta CE, Coura JR: Cross-sectional study defines difference in malaria morbidity in two Yanomami communities on Amazonian boundary between Brazil and Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99:369-376.

Mendoza NM, Nicholls RS, Olano VA, Cortés LJ RJ. Manejo Integral de Malaria. Bogotá D.C.: Instituto Nacional de Salud; 2000.

Ministerio de Salud y Protección Social, Secretaria Departamental de Salud del Cauca, Análisis de situación de salud con el modelo de los determinantes sociales de salud del municipio de Guapi -Departamento del Cauca.2013.

Niang M, Thiam LG, Sane R, Diagne N, Talla C, Doucoure S, Faye J, Diop F, Badiane A, Diouf B, Camara D, Diene-Sarr F, Sokhna C, Richard V, Toure-Balde A. Substantial asymptomatic submicroscopic *Plasmodium* carriage during dry season in low transmission areas in Senegal: Implications for malaria control and elimination. PLoS One. 2017 Aug 3;12(8):e0182189. doi: 10.1371/journal.pone.0182189. eCollection 2017.

Orellano PW, Reynoso JI. Nuevo método para elaborar corredores endémicos. Rev Panam Salud Publica. 2011;29(5):309–14.

Organización Mundial de la Salud (OMS). Terminología del Paludismo. Ginebra, 2017. WHO/HTM/GMP/2016.6. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/258964/WHO-HTM-GMP-2016.6-spa.pdf?sequence=1>.

Osorio L, Todd J, Bradley D. Ausencia de malaria asintomática en escolares de Quibdó, Chocó. Biomédica. 2004;24:13-19.

Rodríguez JC, Uribe GÁ, Araújo RM, Narváez PC, Valencia SH. Epidemiology and control of malaria in Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011 Aug;106 Suppl 1:114-22

Roper MH, Torres RS, Goicochea CG, Andersen EM, Guarda JS, Calampa C, Hightower AW, Magill AJ. The epidemiology of malaria in an epidemic area of the Peruvian Amazon. Am J Trop Med Hyg. 2000;62:247–256.

Roshanravan B, Kari E, Gilman RH, Cabrera L, Lee E, Metcalfe J, Calderon M, Lescano AG, Montenegro SH, Calampa C, Vinetz JM: Endemic malaria in the Peruvian Amazon region of Iquitos. Am J Trop Med Hyg. 2003;69:45–52.

Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, Thaithong S, Brown KN. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. Mol Biochem Parasitol. 1993 Oct;61(2):315-20.

Suárez-Mutis MC, Cuervo P, Leoratti FM, Moraes-Avila SL, Ferreira AW, Fernandes O, Coura JR. Cross sectional study reveals a high percentage of asymptomatic *Plasmodium vivax* infection in the Amazon Rio Negro area, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2007 May-Jun;49(3):159-64.

Tada MS, Marques RP, Mesquita E, Dalla Martha RC, Rodrigues JA, Costa JD, Pepelascov RR, Katsuragawa TH, Pereira-da-Silva LH. Urban malaria in the Brazilian Western Amazon Region I: high prevalence of asymptomatic carriers in an urban riverside district is associated with a high level of clinical malaria. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007 Jun;102(3):263-9.

Vallejo AF, Chaparro PE, Benavides Y, Álvarez Á, Quintero JP, Padilla J, Arévalo-Herrera M, Herrera S. High prevalence of sub-microscopic infections in Colombia. Malar J. 2015 May 15;14:201. doi: 10.1186/s12936-015-0711-6.

Vásquez-Jiménez JM, Arévalo-Herrera M, Henao-Giraldo J, Molina-Gómez K, Arce-Plata M, Vallejo AF, Herrera S. Consistent prevalence of asymptomatic infections in malaria endemic populations in Colombia over time. *Malar J.* 2016 Feb 6;15:70. doi: 10.1186/s12936-016-1124-x.

White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM. Malaria. *Lancet.* 2014 Feb 22;383(9918):723-35. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60024-0. Epub 2013 Aug 15. Review.



## **3. Objetivo específico 2**

### **3.1 Objetivo específico 2**

Determinar las características genotípicas y la estructura de población de los parásitos causantes de malaria sintomática en Guapi-Cauca, Colombia.

### **3.2 Metodología**

#### **3.2.1 Tipo de estudio**

Estudio experimental descriptivo. Entre agosto de 2014 y agosto de 2017 se recolectaron muestras de sangre de individuos sintomáticos para malaria, quienes asistieron a alguno de los cuatro puestos de la red de diagnóstico de la malaria en la región (Guapi, El Cuerval, El Carmelo y Chanzará) y se extrajo el ADN parasitario para realizar la caracterización de su genotipo. Se caracterizaron los genotipos de los parásitos causantes de la malaria, analizando polimorfismos de nucleótido único (SNPs) asociados a genes de resistencia en *P. falciparum*. Adicionalmente a la caracterización genotípica de los parásitos, se determinó la estructura de la población de los parásitos mediante 101 SNPs bialélicos, cuyas combinaciones permitieron emular un código de barras para cada individuo; estos 101 SNPs están ubicados a lo largo del genoma de *P. falciparum* en genes que no están asociados con la resistencia del parásito a los antimaláricos. La selección de SNPs para genotipificar el parásito y determinar la estructura poblacional de *P. falciparum* estuvo determinada por su reconocida utilidad en el análisis genético y la caracterización de la estructura de población de *P. falciparum* demostrada anteriormente en diferentes estudios (Galinsky K, et al., 2015; Ariey F, et al., 2014; Oyola SO, et al., 2016; MalariaGEN *Plasmodium falciparum* Community Project, 2016).

Al final del estudio, se obtuvieron entonces dos tipos de resultados: 1). Datos haplotípicos, producto del análisis de SNPs asociados a genes de resistencia en *P.*

*falciparum* y que permitieron hacer inferencias sobre vías mutacionales, patrones de selección y origen y diseminación de parásitos resistentes y 2). Variables demográficas, producto del análisis de polimorfismos neutros (101 SNPs), lo cual dio cuenta de la variabilidad de los individuos en la población de *P. falciparum* (ya sea por selección o por deriva) y que permitieron estimar las relaciones de descendencia o procesos de selección.

### **3.2.2 Recolección y procesamiento de las muestras**

Se recolectaron 4 ml de sangre venosa en tubo con EDTA de cada paciente positivo para malaria por gota gruesa, diagnosticado en alguno de los puestos de la red de diagnóstico en la región (Guapi, El Cuerval, El Carmelo y Chanzará), entre agosto de 2014 y agosto de 2017. Se incluyeron individuos mayores de 2 años de edad, con diagnóstico de malaria no complicada y que firmaron el documento de consentimiento informado (Anexo A: Consentimiento y asentimiento informado “Búsqueda Pasiva”).

Para reducir la cantidad de ADN humano presente en la muestra final se removieron los leucocitos de las muestras de sangre total en las instalaciones del puesto de diagnóstico de malaria en Guapi, Cauca. Para ello, la sangre se transfirió a un tubo de centrifuga de 15 ml, se diluyó 1:1 volumen a volumen con buffer fosfato salino (PBS) y se pasó por columnas de celulosa (Cellulose MN 2100ff. Ref: 815070.1) prelavadas con 6 ml de PBS. El filtrado obtenido se centrifugó a 1000g durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se almacenó en crioviales a -20°C (WAARN, 2011).

### **3.2.3 Extracción de ADN del parásito**

La extracción del ADN genómico de los parásitos se realizó a partir del sedimento obtenido de la filtración por columnas de celulosa, siguiendo el protocolo del Kit-QIAGEN, QIAamp® DNA Blood Midi/Maxi Handbook - Qiagen, Anexo B. Esta extracción fue realizada en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia y el ADN fue enviado al Programa Malaria del Wellcome Sanger Institute, en Cambridge, Reino Unido para la obtención de los SNPs asociados o no a genes de resistencia a los antimaláricos (Tabla 3-1 y Tabla 3-2).

### 3.2.4 Genotipificación de SNPs

La genotipificación de los 101 SNPs ubicados en genes no relacionados con resistencia a antimaláricos y de los SNPs en genes relacionados con resistencia fue realizada en el Sistema AGENA MASS ARRAY, el cual es una plataforma de detección no fluorescente que utiliza espectrometría de masas para medir con precisión los amplicones derivados de PCR. El ADN purificado se sometió a una primera amplificación múltiple, utilizando iniciadores específicos para los diferentes loci de interés. Para la segunda amplificación se empleó una PCR de extensión de base única donde fueron utilizados iniciadores específicos para cada SNP. Todas las reacciones fueron realizadas en 4 réplicas con el fin de obtener un solapamiento en el peso molecular del producto analizado. Los productos de PCR se detectaron en chips de matriz AGENA de 384 pozos y se analizaron mediante espectrometría de masas. La intensidad de la señal para cada muestra se procesó y analizó comparada con controles blanco para cada lote de 384 muestras correspondiente a cada chip. La corrección de ruido de fondo se aplicó a cada ensayo por separado y se definió como dos veces la desviación estándar del valor promedio de todos los pozos con controles en blanco. Las intensidades se utilizaron para determinar la calidad de la muestra inicial, en la que las muestras con una intensidad general (promedio)  $<0$  se eliminaron de los análisis posteriores. Para los SNPs, todas las intensidades de señal debieron ser directamente comparables. Las intensidades por muestra fueron normalizadas por cuantiles y escaladas en  $\log_2$ . El análisis de los SNPs de loci bialélicos se automatizó y se basó en un algoritmo heurístico de dos pasos desarrollado en el Wellcome Sanger Institute. Las intensidades normalizadas permitieron clasificar la muestra como muestra pura o una muestra mixta. Los valores fuera de la distribución normal de una sola cola para los alelos de referencia o que no son de referencia se clasificaron como mixtos. Los loci multialélicos se sometieron a un procesamiento idéntico pero los genotipos finales se determinaron mediante la distribución de muestras puras en un espacio de tres o cuatro dimensiones y todos los alelos se inspeccionaron visualmente de forma manual. Este procedimiento se llevó a cabo en el Programa Malaria del Wellcome Sanger Institute, en Cambridge, Reino Unido.

### 3.2.5 Caracterización de los genotipos relacionados con SNPs asociados a genes de resistencia a los antimaláricos

Se caracterizaron los genotipos de *P. falciparum* a partir de genes asociados a la resistencia a los antimaláricos que portaban los SNPs de interés. Los genotipos fueron informados como posiciones de aminoácidos y alelos correspondientes a cada gen. En algunos casos el genotipo no pudo ser detectado o se detectó una infección múltiple, es decir, se observaron dos alelos. Para el análisis se usaron los programas Microsoft Excel y GraphPad Prisma 7®. En la Tabla 3-1 se listan los genes, los codones evaluados en cada gen y los haplotipos silvestres correspondientes (Spot Malaria. Genetic Report Card User Guide. 2017. Disponible en: <https://www.malariagen.net/projects/spotmalaria>). En el Anexo B se enseña el esquema general de la estructura de cada uno de los genes asociados a la resistencia a los antimaláricos estudiados.

**Tabla 3-1:** Genes asociados a la resistencia a los antimaláricos, codones evaluados en cada gen y haplotipos silvestres correspondientes.

Medicamento antimalárico relacionado con el gen	Gen	Codon	Haplotipo silvestre
Cloroquina	<i>pfcr1</i>	72, 73, 74, 75, 76	CVMNK
Pirimetamina	<i>pfdhfr</i>	51, 59, 108, 164	NCSI
Sulfadoxina	<i>pfdhps</i>	436, 437, 540, 581, 613	SAKAA
Piperaquina	<i>exonuclease (pfexo)</i>	415	E
Cloroquina Amodiaquina Lumefantrina Mefloquina	<i>pfmdr1</i>	86, 184, 1246	NYD
Artemisinina PGB <sup>1</sup>	<i>pfarps10</i>	127, 128	VDDNIT*
	<i>ferredoxin</i>	193	
	<i>pfcr1</i>	326, 356	
	<i>pfmdr2</i>	484	

<sup>1</sup> PGB: del inglés, parasite genetic background.

\* En el caso de PGB, por tratarse de un conjunto de genes, la forma silvestre corresponde al conjunto de SNPs en los cuatro genes relacionados con resistencia a la artemisinina y por esta razón no se hace referencia a un haplotipo.

### 3.2.6 Análisis del conjunto de SNPs (código de barras) y determinación de la estructura de la población de *P. falciparum*

A cada muestra se le asignó un código de barras establecido a partir de 101 SNPs del genoma de *P. falciparum*. Estos SNPs fueron representados por el nucleótido observado (A, T, C y G). En algunos casos el genotipo no pudo ser detectado o se detectó una infección múltiple, es decir, se observaron ambos alelos (Spot Malaria. Genetic Report Card User Guide. 2017. Disponible en: <https://www.malariagen.net/projects/spotmalaria>). En la Tabla 3-2 se presenta una lista del conjunto de SNPs utilizados para el código de barras. La realización de este procedimiento se llevó a cabo en el Programa Malaria del Wellcome Sanger Institute, en Cambridge, Reino Unido.

**Tabla 3-2:** SNPs usados para el análisis de la estructura poblacional de *P. falciparum*.

Num	Chr	Pos	Ref	Nonref	GeneId	GeneDescription	MutType	MutName	Strand
1	Pf3D7_02_v3	376222	A	G	PF3D7_0209000	6-cysteine protein (P230)	N	K1929E	+
2	Pf3D7_02_v3	470013	G	A	PF3D7_0211700	protein kinase, putative (TKL1)	N	G75E	+
3	Pf3D7_03_v3	656861	T	G	PF3D7_0316200	conserved Plasmodium protein, unknown function	S	129V	-
4	Pf3D7_04_v3	110442	C	T	PF3D7_0401900	acyl-CoA synthetase (ACS6)	N	G285E	-
5	Pf3D7_04_v3	881571	A	G	PF3D7_0419900	phosphatidylinositol 4-kinase, putative	S	1081R	+
6	Pf3D7_05_v3	350933	G	A	PF3D7_0508500	guanidine nucleotide exchange factor (RCC1)	S	1369N	-
7	Pf3D7_05_v3	369740	T	C	PF3D7_0508900	conserved Plasmodium protein, unknown function	S	907L	+
8	Pf3D7_06_v3	900278	G	A	PF3D7_0622100	conserved Plasmodium protein, unknown function	N	P696S	-
9	Pf3D7_07_v3	1044052	T	C	PF3D7_0724700	conserved Plasmodium protein, unknown function	S	686K	-
10	Pf3D7_08_v3	1314831	G	A	PF3D7_0830800	surface-associated interspersed gene 8.2 (SURFIN8.2) (SURF8.2)	S	1342K	+
11	Pf3D7_08_v3	413067	A	G	PF3D7_0808100	conserved Plasmodium protein, unknown function	S	1044V	+
12	Pf3D7_09_v3	900277	A	G	PF3D7_0922100	ubiquitin-like protein, putative	S	1534E	+
13	Pf3D7_11_v3	1018899	T	C	PF3D7_1126100	ThiF family protein, putative	S	1199L	-
14	Pf3D7_11_v3	1815412	C	G	PF3D7_1145800	conserved Plasmodium protein, unknown function	N	E765Q	-
15	Pf3D7_13_v3	1056452	T	C	PF3D7_1325400	conserved Plasmodium protein, unknown function	S	1234D	+
16	Pf3D7_13_v3	1466422	G	C	PF3D7_1335900	sporozoite surface protein 2+(TRAP)	N	N66K	-
17	Pf3D7_14_v3	137622	T	C	PF3D7_1403800	nuclear formin-like protein (MISFIT)	S	1179V	-
18	Pf3D7_14_v3	2164225	A	G	PF3D7_1452600	conserved Plasmodium protein, unknown function	S	2830S	+
19	Pf3D7_01_v3	145515	T	A	PF3D7_0103300	conserved Plasmodium protein, unknown function	S	294I	-
20	Pf3D7_03_v3	548178	C	A	PF3D7_0313400	conserved Plasmodium protein, unknown function	N	R2L	-
21	Pf3D7_04_v3	1102392	A	T	PF3D7_0424400	surface-associated interspersed gene 4.2, (SURFIN4.2) (SURF4.2)	N	E808D	+

Tabla 3-2: (Continuación).

22	PF3D7_04_v3	139051	G	T	PF3D7_0402300	normocyte binding protein 1,reticulocyte binding protein homologue 1+(RH1)	N	K438N	+
23	PF3D7_04_v3	286542	G	T	PF3D7_0405300	sequestrin	N	H586N	-
24	PF3D7_04_v3	529500	G	A	PF3D7_0411900	DNA polymerase alpha	S	1477Y	-
25	PF3D7_05_v3	796714	A	G	PF3D7_0519300	cytochrome c+oxidase assembly protein (heme A:+farnesyltransferase), putative	S	396K	+
26	PF3D7_07_v3	1256331	C	T	PF3D7_0729500	mRNA (N6-adenosine)-methyltransferase, putative	N	L321F	+
27	PF3D7_07_v3	461139	G	A	PF3D7_0710100	conserved Plasmodium protein, unknown function	N	M361I	+
28	PF3D7_07_v3	619957	G	C	PF3D7_0713600	mitochondrial ribosomal protein S5 precursor, putative	S	675R	+
29	PF3D7_08_v3	417335	C	T	PF3D7_0808200	plasmepsin X	N	R244K	-
30	PF3D7_09_v3	163977	C	T	PF3D7_0903500	conserved Plasmodium protein, unknown function	S	403D	+
31	PF3D7_10_v3	317581	A	T	PF3D7_1007900	eukaryotic translation initiation factor 3+subunit 7, putative	S	311I	+
32	PF3D7_10_v3	336274	A	G	PF3D7_1008100	conserved Plasmodium protein, unknown function	N	I1677V	+
33	PF3D7_11_v3	1020397	C	T	PF3D7_1126100	ThiF family protein, putative	N	G700E	-
34	PF3D7_11_v3	1294107	C	T	PF3D7_1133400	apical membrane antigen 1+(AMA1)	S	84A	+
35	PF3D7_11_v3	1935227	T	A	PF3D7_1148700	Plasmodium exported protein (PHISTc), unknown function (GEXP12)	N	R73S	-
36	PF3D7_11_v3	477922	C	T	PF3D7_1112500	conserved Plasmodium protein, unknown function	N	H147Y	+
37	PF3D7_12_v3	1663492	A	G	PF3D7_1239800	conserved Plasmodium protein, unknown function	S	1014E	+
38	PF3D7_12_v3	2171901	T	A	PF3D7_1253100	Plasmodium exported protein (PHISTa), unknown function	N	V140D	+
39	PF3D7_13_v3	1233218	T	C	PF3D7_1329100	myosin C+(MyoC)	N	N277S	-
40	PF3D7_13_v3	1867630	G	C	PF3D7_1346400	conserved Plasmodium protein, unknown function	N	M4911I	+
41	PF3D7_13_v3	2377887	C	A	PF3D7_1359600	conserved Plasmodium protein, unknown function	S	2002S	+
42	PF3D7_14_v3	2355751	T	A	PF3D7_1457400	conserved Plasmodium protein, unknown function	N	H1589Q	+
43	PF3D7_14_v3	3046108	C	T	PF3D7_1474400	conserved Plasmodium protein, unknown function	S	417V	+
44	PF3D7_02_v3	529709	T	A	PF3D7_0212800	multidrug efflux pump, putative	N	F487L	+
45	PF3D7_02_v3	714480	T	C	PF3D7_0217200	conserved Plasmodium protein, unknown function	N	D258G	-
46	PF3D7_03_v3	155697	A	G	PF3D7_0302900	exportin 1, putative	S	150P	-
47	PF3D7_04_v3	1037656	A	T	PF3D7_0422500	pre-mRNA-splicing helicase BRR2, putative (BRR2)	S	2776I	+
48	PF3D7_04_v3	648101	G	A	PF3D7_0414200.1	calmodulin-like protein	S	51V	-
49	PF3D7_05_v3	1204155	A	C	PF3D7_0529400.1	conserved Plasmodium protein, unknown function	S	1338I	+
50	PF3D7_06_v3	1282691	G	A	PF3D7_0630600	conserved Plasmodium protein, unknown function	S	803K	+
51	PF3D7_06_v3	1289212	A	G	PF3D7_0630800	conserved Plasmodium protein, unknown function	S	125T	+
52	PF3D7_07_v3	1066698	G	A	PF3D7_0725100	conserved Plasmodium membrane protein, unknown	N	G483S	+
53	PF3D7_07_v3	1213486	G	A	PF3D7_0728200	actin-like protein, putative	N	S543N	+
54	PF3D7_07_v3	704373	A	G	PF3D7_0716000	RNA binding protein, putative	S	389E	+
55	PF3D7_08_v3	1313202	T	C	PF3D7_0830800	surface-associated interspersed gene 8.2 (SURFIN8.2) (SURF8.2)	S	799F	+
56	PF3D7_08_v3	339406	A	G	PF3D7_0806300	ferlin like protein, putative	S	1283C	-
57	PF3D7_08_v3	701557	T	G	PF3D7_0814500	conserved Plasmodium protein, unknown function	S	394G	+
58	PF3D7_09_v3	452690	A	G	PF3D7_0910000	SET domain protein, putative (SET4)	S	1018I	-
59	PF3D7_09_v3	599655	G	C	PF3D7_0914000	pseudouridylylase synthase, putative	N	E654D	+
60	PF3D7_10_v3	1383789	A	C	PF3D7_1034900	methionine-tRNA ligase, putative	N	N114H	+
61	PF3D7_10_v3	1385894	C	T	PF3D7_1034900	methionine-tRNA ligase, putative	S	815P	+
62	PF3D7_11_v3	1006911	A	T	PF3D7_1125700	kelch protein, putative	N	D124E	-
63	PF3D7_11_v3	1295068	G	A	PF3D7_1133400	apical membrane antigen 1+(AMA1)	N	E405K	+
64	PF3D7_11_v3	1802201	G	A	PF3D7_1145400	dynamine-like protein (DYN1)	S	450S	-
65	PF3D7_12_v3	1667593	T	C	PF3D7_1239800	conserved Plasmodium protein, unknown function	S	2381N	+
66	PF3D7_12_v3	1934745	G	A	PF3D7_1246500	conserved Plasmodium protein, unknown function	S	241L	-
67	PF3D7_12_v3	858501	C	A	PF3D7_1221400	membrane skeletal protein, putative (ALV3)	N	Q469K	+
68	PF3D7_13_v3	1419519	T	C	PF3D7_1335100	merozoite surface protein 7+(MSP7)	N	Q208R	-
69	PF3D7_13_v3	159086	A	G	PF3D7_1303100	methyltransferase-like protein, putative	S	21R	+
70	PF3D7_13_v3	2161975	T	A	PF3D7_1354200	inositol-polyphosphate 5-phosphatase, putative	N	D252V	-
71	PF3D7_13_v3	2573828	A	C	PF3D7_1364200	conserved Plasmodium protein, unknown function	N	I1153M	-
72	PF3D7_13_v3	388365	A	C	PF3D7_1308400	conserved Plasmodium protein, unknown function	N	S1236R	-
73	PF3D7_14_v3	2625887	C	G	PF3D7_1464700	ATP synthase (C/AC39) subunit, putative	N	M238I	-
74	PF3D7_14_v3	3126219	C	T	PF3D7_1475900	conserved Plasmodium protein, unknown function	N	S628F	+
75	PF3D7_14_v3	438592	A	C	PF3D7_1410900	conserved Plasmodium protein, unknown function	N	N348T	+
76	PF3D7_01_v3	179347	A	G	PF3D7_0104100	conserved Plasmodium membrane protein, unknown function	S	311G	+
77	PF3D7_01_v3	180554	G	A	PF3D7_0104100	conserved Plasmodium membrane protein, unknown function	N	D714N	+
78	PF3D7_01_v3	283144	C	G	PF3D7_0106700	small ribosomal subunit assembling AARP2 protein (AARP2)	N	H664D	+
79	PF3D7_01_v3	535211	C	T	PF3D7_0113800	DBL containing protein, unknown function	S	2521F	+
80	PF3D7_02_v3	839620	T	C	PF3D7_0220800	cytoadherence linked asexual protein 2+(CLAG2)	S	260L	+
81	PF3D7_04_v3	426436	A	C	PF3D7_0408900.1	peptidase, M22 family, putative	N	D560A	-
82	PF3D7_04_v3	531138	G	T	PF3D7_0411900	DNA polymerase alpha	N	A992E	+
83	PF3D7_04_v3	891732	A	C	PF3D7_0419900	phosphatidylinositol 4-kinase, putative	N	R4468S	+
84	PF3D7_05_v3	172801	G	A	PF3D7_0504400	ATP-dependent helicase, putative	N	E218K	+

**Tabla 3-2: (Continuación).**

85	PF3D7_06_v3	574938	A	C	PF3D7_0613800	transcription factor with AP2 domain(s) (ApiAP2)	N	I2934L	+
86	PF3D7_07_v3	1308383	C	T	PF3D7_0730500	conserved Plasmodium protein, unknown function	N	G1945R	-
87	PF3D7_07_v3	1358910	A	G	PF3D7_0731500	erythrocyte binding antigen-175 (EBA175)	N	K286E	+
88	PF3D7_07_v3	1359218	A	T	PF3D7_0731500	erythrocyte binding antigen-175 (EBA175)	N	K388N	+
89	PF3D7_07_v3	635985	T	C	PF3D7_0713900	conserved Plasmodium protein, unknown function	N	T598A	-
90	PF3D7_08_v3	1056829	C	A	PF3D7_0824200	conserved Plasmodium protein, unknown function	N	L474I	+
91	PF3D7_08_v3	150033	T	C	PF3D7_0802000	glutamate dehydrogenase, putative (GDHc)	S	1315I	+
92	PF3D7_08_v3	399774	C	T	PF3D7_0807800	proteasome subunit alpha type 5, putative	S	421K	-
93	PF3D7_09_v3	1379145	G	A	PF3D7_0935400	cytoadherence linked protein	N	R398Q	+
94	PF3D7_10_v3	1386850	C	T	PF3D7_1035000	U2 snRNA/tRNA pseudouridine synthase, putative	S	927K	-
95	PF3D7_11_v3	1935031	T	A	PF3D7_1148700	Plasmodium exported protein (PHISTc), unknown function (GEXP12)	N	I139L	-
96	PF3D7_11_v3	408668	T	A	PF3D7_1110200	pre-mRNA-processing factor 6, putative (PRPF6)	S	1058I	+
97	PF3D7_11_v3	828596	T	C	PF3D7_1121800	petidase, M16 family	N	K240E	-
98	PF3D7_12_v3	857245	A	G	PF3D7_1221400	membrane skeletal protein, putative (ALV3)	N	E50G	+
99	PF3D7_14_v3	107014	G	A	PF3D7_1402900	conserved Plasmodium protein, unknown function	S	215K	+
100	PF3D7_14_v3	1757603	A	G	PF3D7_1442900	guanine nucleotide exchange factor, putative	N	D1365G	+
101	PF3D7_14_v3	2733656	C	T	PF3D7_1466800	conserved Plasmodium protein, unknown function	S	557C	+

Para la descripción de la estructura de la población de *P. falciparum* y la determinación del grado de flujo genético mediante la utilización de los 101 SNPs, se utilizó el programa especializado Structure 2.3.4 (Pritchard JK, et al., 2000; Falush D, et al., 2007). Para el análisis de clonalidad se usó el programa MEGA 7 (Kumar S, et al., 2016).

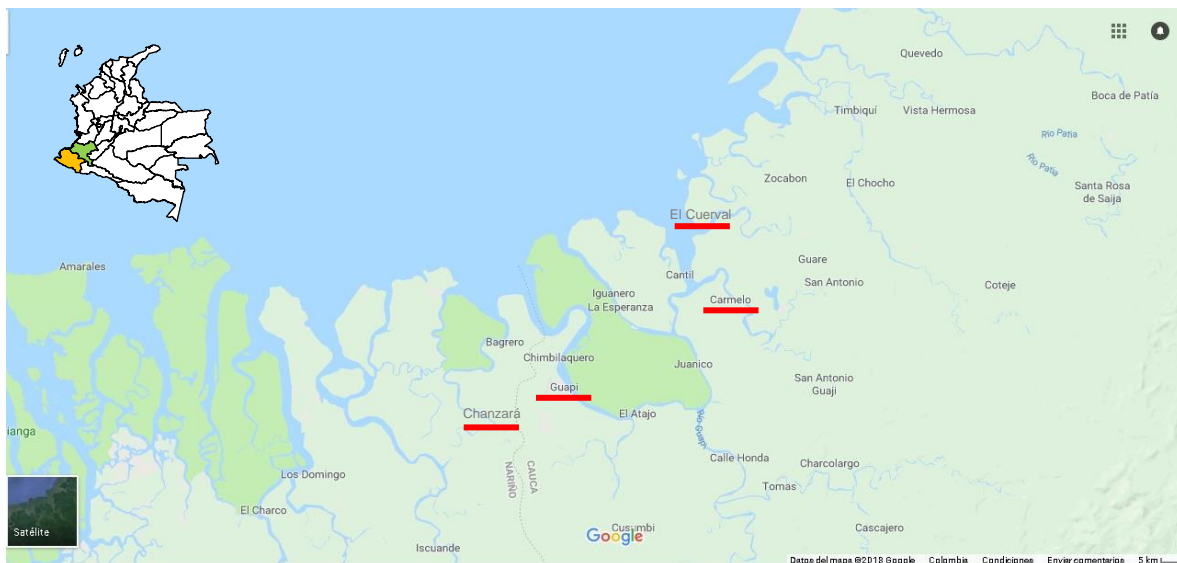
### 3.3 Resultados

#### 3.3.1 Características demográficas y parasitológicas de los individuos con infección sintomática por malaria

En el período comprendido entre agosto de 2014 y agosto de 2017 se recolectaron un total de 498 muestras de infecciones maláricas sintomáticas causadas por *P. falciparum* en 98,2% (489/498) de los casos y por *P. vivax* en 0,6% (3/498); en 1,2% (6/498) de los casos no había dato sobre la especie causante de malaria. El diagnóstico microscópico de todos los pacientes se realizó en 4 puestos pertenecientes a la Red de Diagnóstico de Malaria del departamento del Cauca: 1) Guapi 87,6% (436/498), 2) El Cuerval 7% (35/498), 3) Chanzará 2,8% (14/498) y 4) El Carmelo 2,6% (13/498). Cabe mencionar que Chanzará es una localidad perteneciente al departamento de Nariño, pero por consideraciones logísticas el puesto de diagnóstico es responsabilidad del departamento del Cauca. De los 498 casos, 61,4% (306/498) fueron hombres, 37,8% (188/498) fueron mujeres y en 4 casos (0,8%) no se contó con información. La edad promedio de estos 498 casos fue 25,4 años con un rango entre 2 y 82 años. El promedio de la parasitemia asexual fue de 8133 trofozoítos/ $\mu$ l de sangre, con un rango entre 48 y 76923 trofozoítos/ $\mu$ l de sangre. De los 498 casos, 25 presentaron parasitemia sexual con un promedio de 219 gametocitos/ $\mu$ l de sangre y un rango entre 32 y 592 gametocitos/ $\mu$ l de

sangre. La procedencia geográfica de los casos se encuentra en un área comprendida entre los 33 km al norte de Guapi, 27 km al sur y 17 km al oriente de este municipio, la cual involucra localidades de los departamentos de Cauca y Nariño, sin contar los tres casos procedentes de la zona minera en Venezuela (probablemente del Estado de Bolívar). Cabe destacar que 14,1% (70/498) de los individuos procedía de la zona urbana del municipio de Guapi y el resto de casos de zona rural en los municipios de Timbiquí y Guapi en el departamento de Cauca y localidades rurales del departamento de Nariño (Figura 3-1).

**Figura 3-1:** Mapa con la ubicación geográfica de los puestos de diagnóstico de la Red de Diagnóstico de Malaria del departamento del Cauca: Guapi, El Cuerval, Chanzará y El Carmelo.



### 3.3.2 Genotipificación de los parásitos causantes de infección sintomática a partir de SNPs asociados a genes de resistencia a los antimaláricos

De los 498 casos diagnosticados, se lograron analizar 207 muestras, las cuales correspondieron a aquellas muestras que para el momento del análisis contaron con los resultados de los genotipos reportados por el Programa de Malaria del Wellcome Sanger Institute, en Cambridge, Reino Unido. Las diferencias en los porcentajes entre el grupo del total de casos y las muestras analizadas en relación con el año de diagnóstico, el lugar de procedencia y el sitio de diagnóstico se presentan en la Tabla 3-3. De las



muestras analizadas, 57% (118/207) fueron diagnosticadas en 2017, 46,8% (97/207) procedían de zona rural del municipio de Guapi y se analizaron muestras diagnosticadas en los puestos de Guapi 71,5% (148/207) y El Cuerval 28,5% (59/207). A las 207 muestras se les realizó el análisis de genotipificación de los SNPs asociados a genes de resistencia, los cuales se presentan en la Tabla 3-2.

**Tabla 3-3:** Distribución de los casos de malaria y de las muestras analizadas por año, procedencia y puesto de diagnóstico. Región Guapi-Cauca. 2014-2017.

	Casos totales		Muestras analizadas	
	Número de casos n = 498	Porcentaje	Número de muestras n = 207	Porcentaje
<b>Año de diagnóstico</b>				
2014	50	10,1	5	2,4
2015	52	10,4	38	18,4
2016	206	41,4	23	11,1
2017	138	27,7	118	57,0
Sin información	52	10,4	23	11,1
<b>Procedencia del caso</b>				
Zona urbana de Guapi, Cauca	70	14,1	30	14,6
Zona rural de Guapi, Cauca	250	50,2	97	46,8
Zona rural de Timbiquí, Cauca	39	7,8	33	15,9
Zona rural de Nariño	71	14,3	25	12,1
Zona minera Venezuela	3	0,6	2	1,0
Origen desconocido Guapi, Cauca	61	12,2	20	9,7
Sin información	4	0,8	0	0
<b>Puesto de diagnóstico</b>				
Guapi	436	87,6	148	71,5
El Cuerval	35	7,0	59	28,5
Chanzará	14	2,8	0	0,0
El Carmelo	13	2,6	0	0,0

Durante la evaluación de los SNPs relacionados con los genes asociados a la resistencia incluidos en este estudio, se obtuvo información de todos los alelos evaluados en 3,9% (8/207) de las muestras para el gen *pfcr1*, en 63,8% (132/207) para el gen *pfdhfr*, en 44% (91/207) para el gen *pfdhps*, en 93,2% (193/207) para el gen *pfexo*, en 24,6% (51/207) para el gen *pfmdr1* y en 39,6% (82/207) para la combinación PGB. Se identificaron haplotipos silvestres en todos los genes, excepto en *pfcr1* y *pfmdr1*. Los haplotipos completos con y sin mutaciones se distribuyeron de manera homogénea en los 6 lugares de procedencia, aunque se identificaron mayores frecuencias en la zona rural de Guapi, teniendo en cuenta que este lugar tenía el mayor número de muestras procesadas. En todos los genes se identificaron haplotipos mutantes (simples, dobles o triples mutantes) excepto en el gen *pfexo*. Para el caso de *pfcr1*, es importante resaltar el hallazgo del haplotipo CVIDT, el cual no había sido descrito previamente en el país. En la Tabla 3-4 y en la Figura 3-2 se encuentra la distribución por procedencia de los haplotipos completos de cada gen.

**Tabla 3-4:** Distribución de los haplotipos completos en cada gen por lugar de procedencia. Región Guapi-Cauca. 2014-2017.

Gen/ Haplotipo	No. de muestras (%)*	Procedencia					
		UG (%)	RG (%)	RT (%)	RN (%)	ZV (%)	DG (%)
<i>pfcr1</i> (8 muestras)							
<u>CVIDT</u>	6 (2,9)	0	6 (100)	0	0	0	0
<u>CVIET</u>	2 (1)	0	1 (50)	0	1 (50)	0	0
<i>pfdhfr</i> (132 muestras)							
<u>NCSI</u> (s)	38 (18,4)	2 (5)	21 (55)	2 (5)	5 (13)	0	8 (21)
<u>NCNI</u>	33 (15,9)	6 (18)	3 (9)	14 (42)	1 (3)	0	9 (27)
<u>ICNI</u>	61 (29,5)	9 (15)	34 (56)	4 (7)	11 (18)	2 (3)	1 (2)
<i>pfdhps</i> (91 muestras)							
<u>SAKAA</u> (s)	65 (31,4)	5 (8)	26 (40)	13 (20)	6 (9)	1 (2)	14 (22)
<u>SGKAA</u>	21 (10,1)	4 (19)	5 (24)	8 (38)	1 (5)	0	3 (14)
<u>SGNAA</u>	5 (2,4)	0	0	1 (20)	3 (60)	0	1 (20)

**Tabla 3-4:** (Continuación)

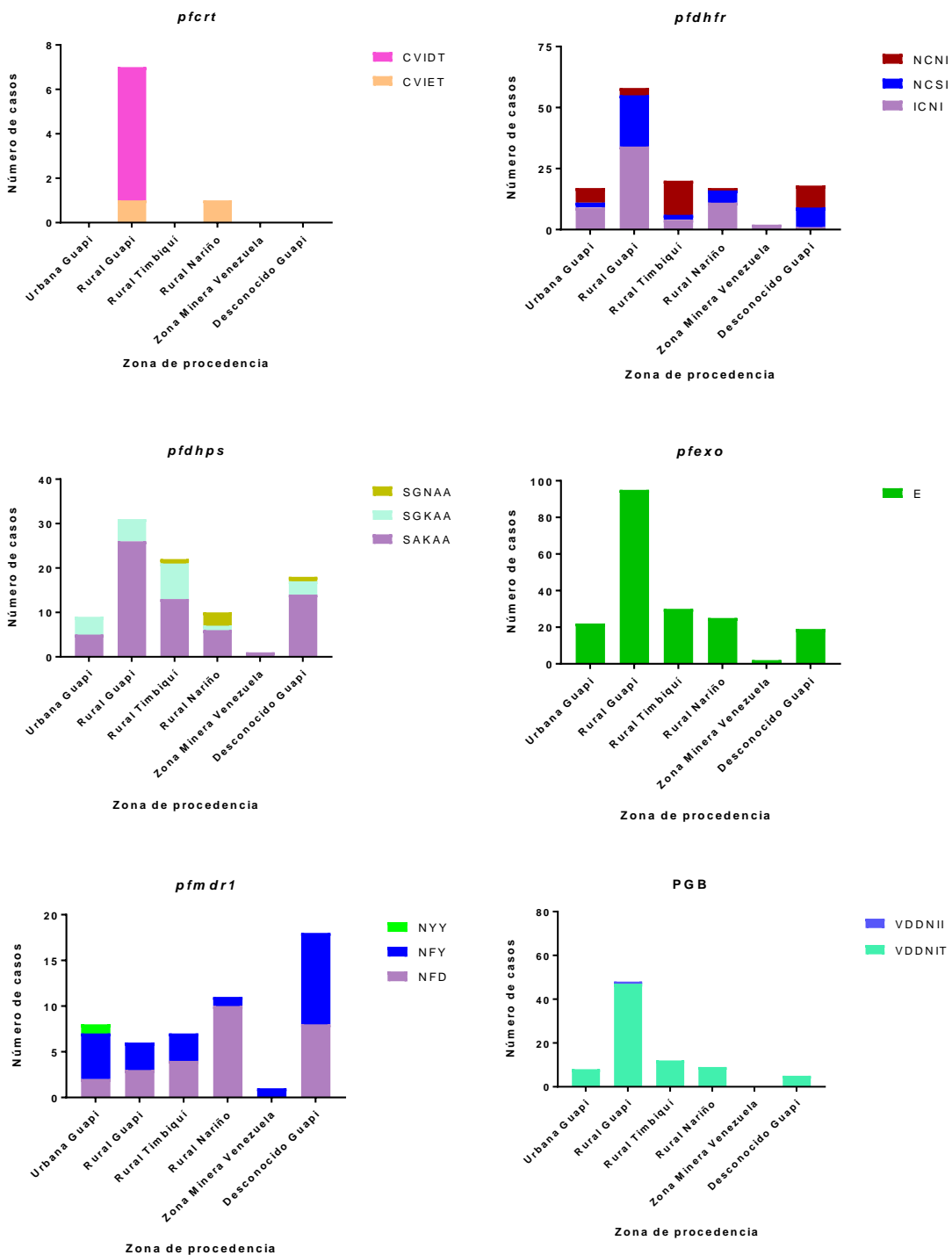
Gen/ Haplotipo	No. de muestras (%)*	Procedencia					
		UG (%)	RG (%)	RT (%)	RN (%)	ZV (%)	DG (%)
<i>pfexo</i> (193 muestras)							
E (s)	193 (93,2)	22 (11)	95 (49)	30 (16)	25 (13)	2 (1)	19 (10)
<i>pfmdr1</i> (51 muestras)							
<u>N</u> ED	27 (13)	2 (7)	3 (11)	4 (15)	10 (37)	0	8 (30)
<u>N</u> F <u>Y</u>	23 (11,1)	5 (22)	3 (13)	3 (13)	1 (4)	1 (4)	10 (43)
<u>N</u> Y <u>Y</u>	1 (0,5)	1 (100)	0	0	0	0	0
PGB (82 muestras)							
VDDNIT (s)*	81 (39,1)	8 (10)	47 (58)	12 (15)	9 (11)	0	5 (6)
VDDNI <u>I</u>	1 (0,5)	0	1 (100)	0	0	0	0

(s)=haplotipo silvestre. La mutación en cada gen está subrayada en la posición correspondiente a la misma. UG=urbana Guapi. RG=rural Guapi. RT=rural Timbiquí. RN=rural Nariño. ZV= zona minera en Venezuela. DG= desconocido Guapi.\*: En el caso de PGB, por tratarse de una combinación de sitios polimórficos en varios genes, la forma silvestre corresponde al conjunto de SNPs en los cuatro genes asociados a la aparición potencial de resistencia a la artemisinina y por esta razón no se hace referencia a un haplotipo

\*Este porcentaje es producto de la relación con el total de las 207 muestras analizadas

Al frente de cada gen se encuentra el número del total del muestras con genotipo completo (en todos los alelos evaluados) para el gen en particular

**Figura 3-2:** Distribución por procedencia de los haplotipos completos y con mayor frecuencia para cada gen. Región Guapi-Cauca. 2014-2017.



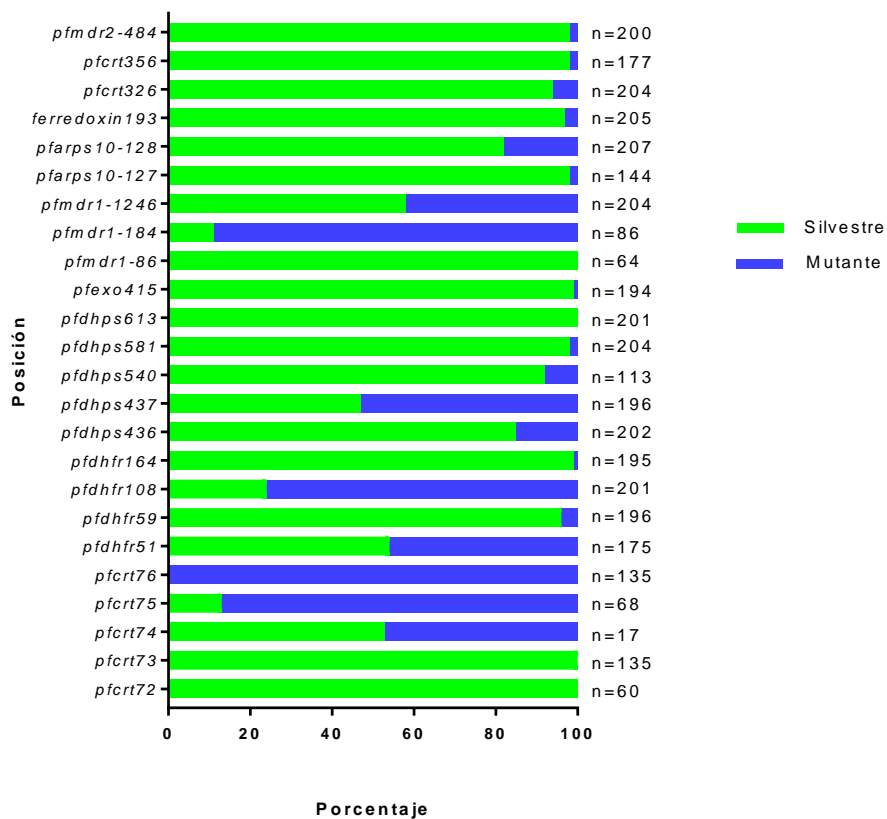
Los haplotipos completos en el gen *pfcr*t identificados con mayor frecuencia fueron CVIDI 6/207 (3%) y CVIET 2/207 (1%), ambos triples mutantes; para este gen, 72/207 muestras (35%) no pudieron ser genotipificadas. En el caso de *pfdhfr* los haplotipos completos más frecuentes fueron ICNI 61/207 (29%), lo que significa doble mutante en las posiciones 51 y 108; NCSI 38/207 (18%), el cual corresponde al haplotipo silvestre y NCNI 33/207 (16%), es decir, el mutante simple en la posición 108. Para *pfdhps* el haplotipo silvestre SAKAA fue el más frecuente 65/207 (31%), seguido del mutante simple en la posición 437 SGKAA con una frecuencia de 10% (21/207) y el doble mutante en las posiciones 437 y 540 SGNAA con una frecuencia de 2% (5/207). Para el gen *pfexo* 93% de los casos (193/207) correspondieron al genotipo silvestre. En cuanto al gen *pfmdr1* los haplotipos completos más frecuentes fueron NED 27/207 (13%), es decir mutante simple en la posición 184, el haplotipo NEY 23/207 (11%), que corresponde al mutante doble en las posiciones 184 y 1246 y el haplotipo NY 1/207 (0,5%), simple mutante en la posición 1246. Para los genes asociados a la aparición de resistencia a la artemisinina, se evidenció el fenotipo silvestre VDDNIT 81/207 (39%); para este conjunto de genes se identificó el fenotipo mutante VDDNI en un solo caso (0,5%) con la mutación en la posición 484 del gen *pfmdr2*.

En cuanto al análisis de polimorfismo de nucleótido único se encontró que en el gen *pfcr*t se identificaron alelos silvestres exclusivamente en las posiciones C72 [100% (60/60)] y V73 [100% (135/135)] y el mutante en la totalidad de los alelos de la posición 76T [100% (135/135)]; en este mismo gen, el alelo silvestre se presentó en 53% (9/17) de los casos en la posición M74 y en 13% (9/68) en la posición N75. En el gen *pfdhfr* los alelos silvestres fueron los más frecuentes en las posiciones N51 [54% (94/175)], C59 [96% (188/196)] y I164 [99% (194/195)]; en la posición 108 el alelo silvestre S108 tuvo una frecuencia intermedia [24% (49/201)]. De igual forma, los alelos silvestres fueron los más frecuentes en el gen *pfdhps*, en las posiciones S436 [85% (172/202)], K540 [92% (104/113)], A581 [98% (200/204)] y A613 [100% (201/201)], mientras que en el caso de la posición A437 el alelo silvestre tuvo una frecuencia intermedia [47% (93/196)]. Casi la totalidad de los alelos en la posición 415 del gen *pfexo* fueron silvestres [99% (193/194)]. Para el gen *pfmdr1* los alelos silvestres tuvieron frecuencias variables en las diferentes posiciones evaluadas: N86 [100% (64/64)], Y184 [11% (9/86)] y D1246 [58% (119/204)]. Para los genes asociados a la resistencia a la artemisinina, predominaron los alelos silvestres, *pfarps* 10-127 [98% (141/144)], *pfarps* 10-128 [82% (170/207)], *ferredoxin* 193

[97% (199/205)], *pfcr1* 326 [94% (192/204)], *pfcr1* 356 [98% (173/177)] y *pfmdr2* 484 [98% (196/200)]. Es importante señalar que en este grupo de genes los alelos mutantes presentaron frecuencias bajas entre 0,5 y 1%, *pfarps* 10-128H [0,5% (1/207)], *ferredoxin* 193Y [1% (2/205)], *pfcr1*326S [0,5% (1/204)], *pfcr1*356I [1% (2/177)] y *pfmdr2*-484I [0,5% (1/200)].

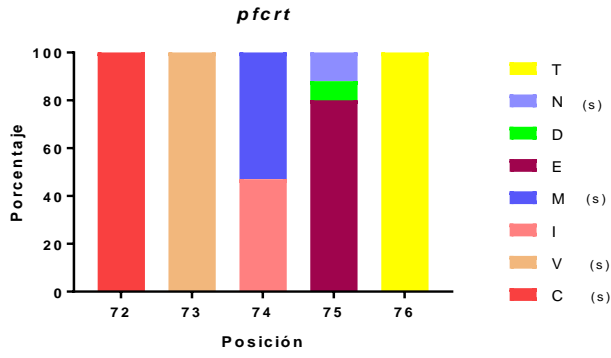
La distribución de alelos mutantes y silvestres por cada posición evaluada se presenta en la Figura 3-3 y los alelos más frecuentes identificados en cada posición evaluada de cada gen se muestran en la Figura 3-4. En la construcción de la Figura 3-3 se incluyeron las infecciones mixtas como parte del porcentaje de los mutantes; es importante señalar que en tres posiciones, además de los alelos silvestres, solo se identificaron infecciones mixtas, *pfdhps* 581\* [2% (4/204)], *pfexo* 415\* [1% (1/194)] y *pfarps*10-127\* [2% (3/144)].

**Figura 3-3.** Frecuencias de alelos silvestres y mutantes por cada posición evaluada en cada uno de los genes analizados. Región Guapi-Cauca. 2014-2017.

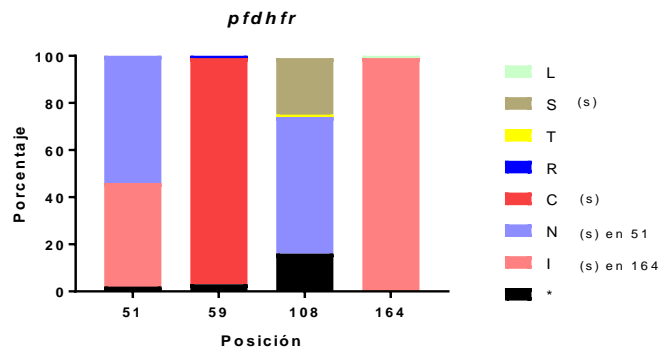


**Figura 3-4:** Frecuencias de los alelos silvestres y mutaciones específicas en cada posición de cada gen evaluado. Región Guapi-Cauca. 2014-2017. A: *pfcr1*, *pfdhfr* y *pfdhps*.

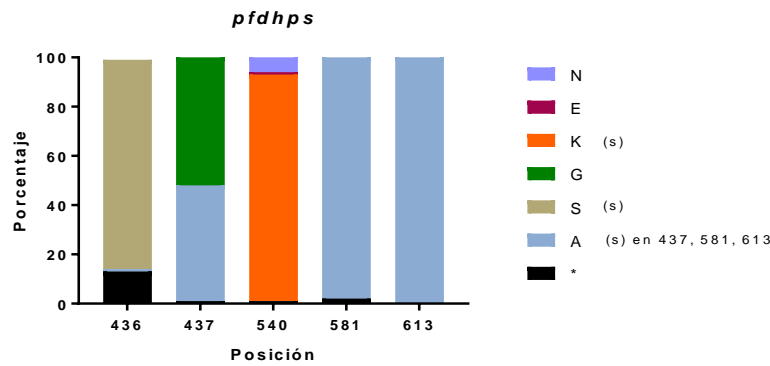
A



(s) = alelo silvestre



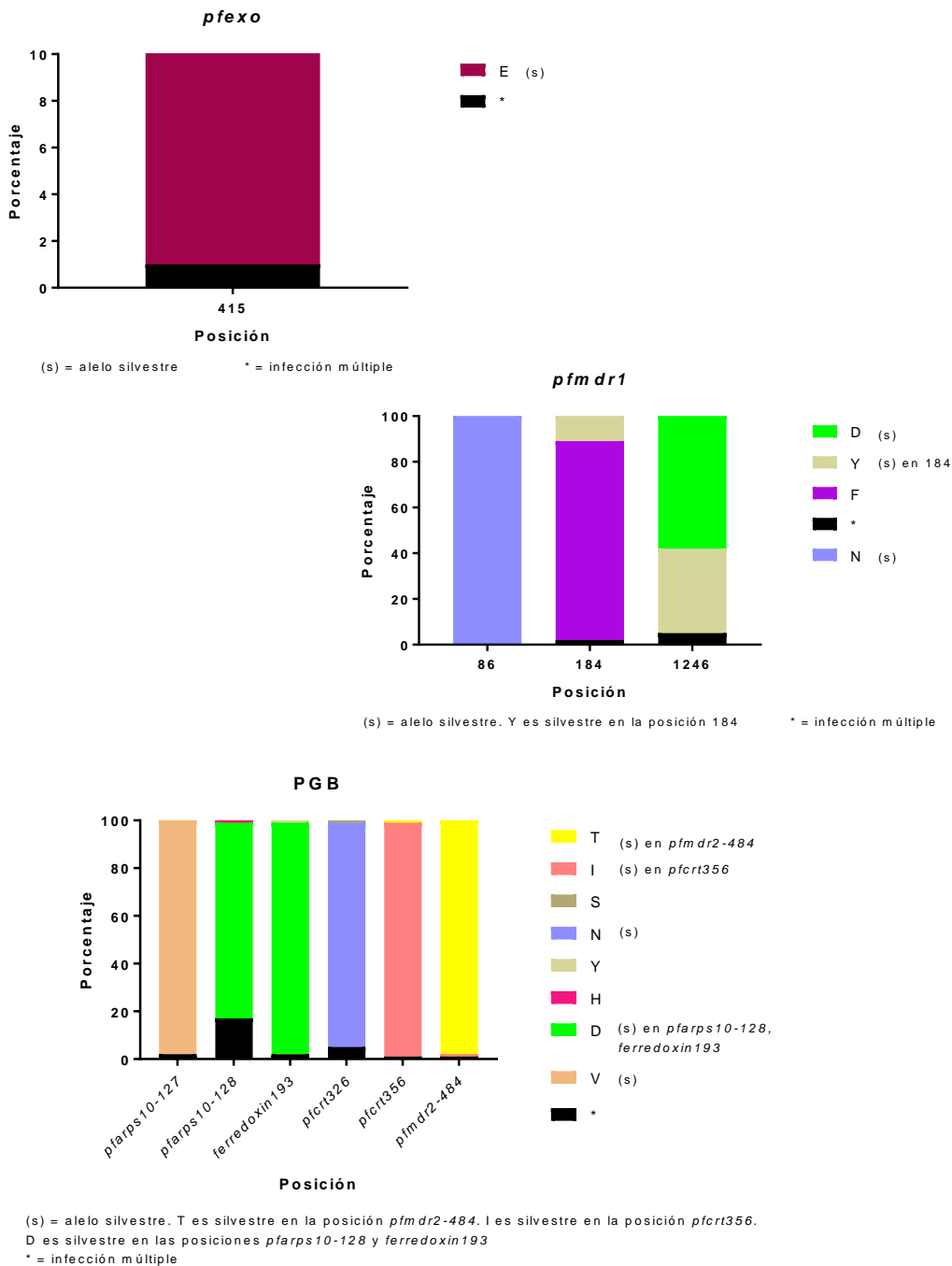
(s) = alelo silvestre. N es silvestre en la posición 51 e I es silvestre en la posición 164  
 \* = infección múltiple



(s) = alelo silvestre. A es silvestre en las posiciones 437, 581 y 613  
 \* = infección múltiple

**Figura 3-4: (Continuación)** Frecuencias de los alelos silvestres y mutaciones específicas en cada posición de cada gen evaluado. Región Guapi-Cauca. 2014-2017. B: *pfexo*, *pfmdr1* y *PGB*.

**B**





### 3.3.3 Identificación y caracterización de las infecciones múltiples en los individuos sintomáticos para malaria

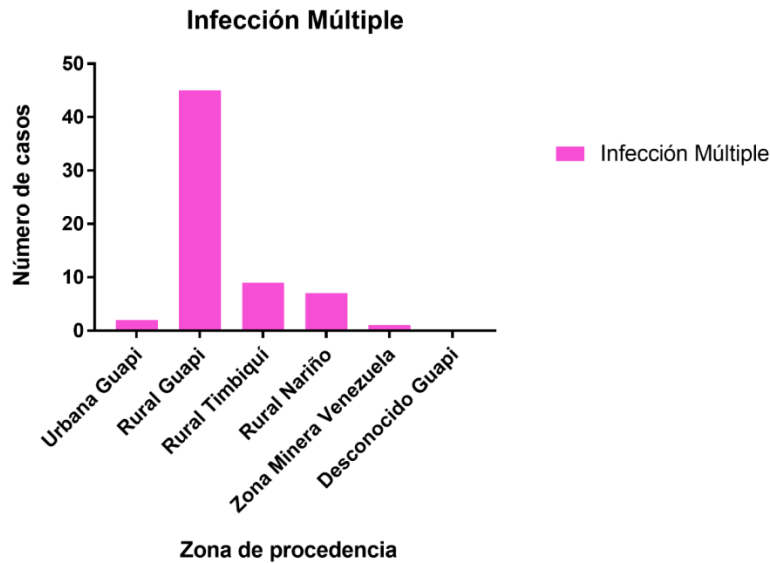
En total se identificaron 64/207 (31%) individuos con infecciones múltiples (más de un clon de *P. falciparum* por muestra), las cuales se señalan con un asterisco (\*). En la Tabla 3-5 se describen los haplotipos de estas infecciones para cada gen evaluado y en la Figura 3-5 se representa la distribución por procedencia del caso. Nuevamente, la infección múltiple se observa con mayor frecuencia en la zona rural de Guapi, pero se debe tener en cuenta que la mayoría de las muestras proceden de este lugar.

**Tabla 3-5:** Distribución de los haplotipos de las infecciones múltiples para cada gen. Región Guapi-Cauca. 2014-2017.

<i>Pfdhfr</i>	#	%	<i>pf dhps</i>	#	%	<i>pfexo</i>	#	%	<i>pfmdr1</i>	#	%	<i>PGB</i>	#	%
***I	2	1,0	*-KAA	1	0,5	*	1	0,5	--*	8	3,9	VD*N-T	1	0,5
*C*I	1	0,5	S-**A	1	0,5	Total	1	0,5	-*Y	2	1,0	VDDNI*	1	0,5
*CTI	1	0,5	SAE*A	1	0,5				-F*	1	0,5	**D*IT	1	0,5
-C*-	1	0,5	SAN*-	1	0,5				Total	11	5,3	**DNIT	1	0,5
I*--	1	0,5	**--AA	1	0,5							**DN-T	1	0,5
I*N-	1	0,5	*--AA	1	0,5							-*DNIT	2	1,0
NC*I	16	7,7	*AKAA	7	3,4							V****T	1	0,5
-*SL	1	0,5	*G-AA	15	7,2							V***IT	1	0,5
-C*I	6	2,9	*GKAA	4	1,9							V*D*IT	4	1,9
I*Ni	1	0,5	S*-AA	1	0,5							V*D-IT	1	0,5
IC*I	6	2,9	SGK*A	1	0,5							V*DN--	1	0,5
IR*I	1	0,5	Total	34	16,4							V*DNIT	21	10,1
Total	38	18										V*DN-T	1	0,5
												V*-NIT	1	0,5
												VD*NI*	1	0,5
												VDD***	1	0,5
												VDD*IT	3	1,4
												Total	43	20,8

(#) = número de muestras. (%) = porcentaje de muestras en relación con los 207 individuos evaluados. Las posiciones de cada gen en las cuales no se obtuvo resultado se señalan con un guion (-).

**Figura 3-5:** Distribución por procedencia de las infecciones múltiples. Región Guapi-Cauca. 2014-2017.



Al usar el método “The Real McCOIL” para la estimación de la infección múltiple a partir de los 101 SNPs en las 207 muestras analizadas, el porcentaje estimado fue de 8,7% (IC 95%: 0,5-1,4), es decir, se identificaron 18 de 207 individuos portadores de más de un parásito genéticamente diferente (Chang HH, et al., 2017). El lugar de procedencia más frecuente de las 18 muestras con infección múltiple identificadas por este método, fue la zona rural de Guapi [83,3% (15/18)], seguido de la zona rural de Nariño [11,1% (2/18)] y la zona urbana de Guapi [5,6% (1/18)].

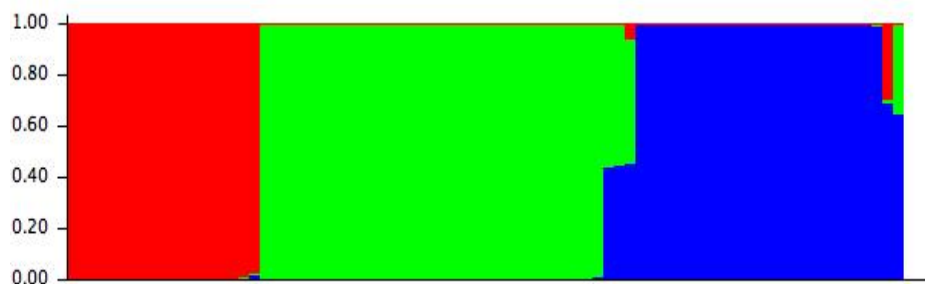
### 3.3.4 Estructura de la población de *P. falciparum*

De los 497 casos diagnosticados en los cuatro puestos de la Red de Diagnóstico de Malaria del Departamento del Cauca y descritos anteriormente, se procesaron un total de 207 muestras para las cuales se generó un perfil de variabilidad o código de barras a partir de 101 SNPs distribuidos a lo largo de todo el genoma de *P. falciparum*.

Con el fin de describir la estructura de la población de *P. falciparum* de las 207 muestras, conocer el grado de intercambio genético y realizar el análisis de clonalidad por medio de los 101 SNPs, se utilizaron los programas especializados Structure 2.3.4 (Pritchard JK, et al., 2000; Falush D, et al., 2007) y MEGA 7 (Kumar S, et al., 2016).

La estructura poblacional de *P. falciparum* se determinó usando el programa Structure 2.3.4 (Pritchard JK, et al., 2000; Falush D, et al., 2007). Este programa emplea las frecuencias alélicas de cada locus para asignar individuos a un determinado número de agrupaciones (“K”) para un determinado grupo de SNPs. En cada simulación, se utilizó un rango de “K” entre 1-10, con 10 iteraciones en cada valor de K, un periodo de burn-in de 100000 iteraciones y 100000 repeticiones de Cadenas de Markov y Montecarlo (MCMC) como parámetros iniciales de corrida. El análisis exploratorio inicial realizó una simulación considerando a todos los individuos como una sola población de *P. falciparum*. El análisis se realizó bajo el parámetro de “admixture”, es decir, asumiendo que más de un grupo genético contribuye al genoma de cada individuo y además se asumió que el origen de cada alelo era independiente. Para este análisis se eliminaron los loci con más de 60% de datos faltantes por posición y las muestras con más de 30% de datos faltantes por individuo. En total se analizaron 84 loci en 78 muestras individuales. Es importante resaltar que 7 de los 101 loci analizados (Pf3D7\_04\_v3:110442, Pf3D7\_08\_v3:1314831, Pf3D7\_03\_v3:548178, Pf3D7\_13\_v3:1867630, Pf3D7\_04\_v3:531138, Pf3D7\_07\_v3:1359218, Pf3D7\_06\_v3:1289212), no arrojaron resultados en 98% de las muestras analizadas, lo cual podría sugerir que estos SNPs no tienen representación en la población de *P. falciparum* de la región. La estructura de la población de *P. falciparum* identificada utilizando en análisis en Structure, se muestra en la Figura 3-6.

**Figura 3-6:** Determinación de la estructura poblacional de *P. falciparum*. Región Guapi-Cauca. 2014-2017.



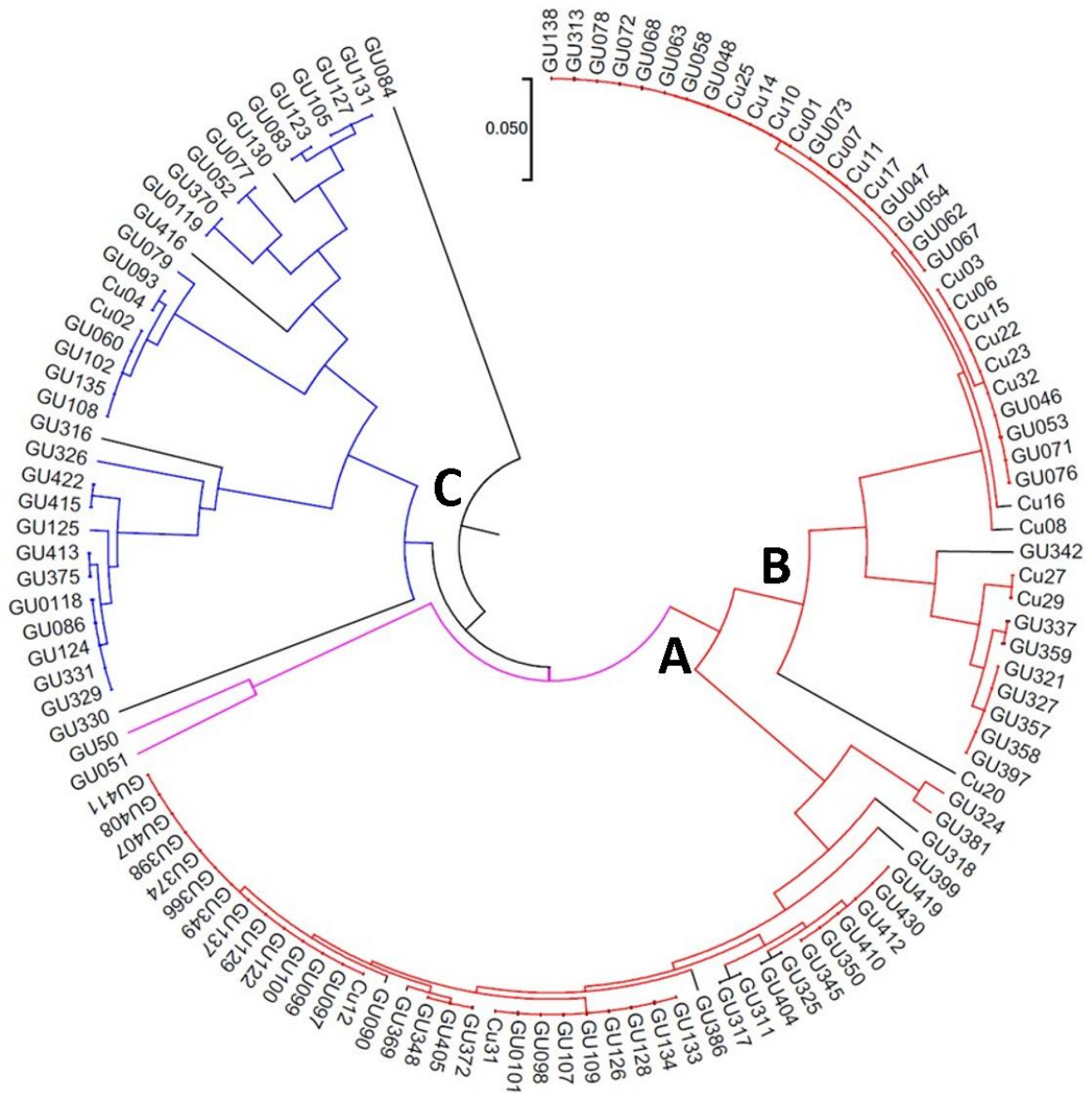
Los colores rojo, verde y azul corresponden a cada una de las tres poblaciones del parásito identificadas en análisis en Structure 2.3.4.

Con los resultados del análisis en Structure 2.3.4., asumiendo que no hay panmixia, es decir, diferencias genéticas en la estructura de población de los parásitos, se identificó una población estructurada con al menos 3 subpoblaciones con diferentes ancestros genéticos puros o mezclados entre sí, cuyos índices  $F_{st}$  fueron de 0,84; 0,77 y 0,39; a pesar de que el origen de los parásitos procede de un área geográfica limitada (aproximadamente 30 Km alrededor del casco urbano de Guapi), no hay una única población de parásitos. Dos de estas subpoblaciones son altamente diferenciadas bajo condiciones simpátricas y con índices  $F_{st}$  altos (0,84 y 0,77). La otra subpoblación, cuyo índice  $F_{st}$  fue de 0,39, corresponde a un grupo de individuos híbridos o recombinantes producto posiblemente de la mezcla de las dos principales subpoblaciones.

El análisis de clonalidad, usando el programa MEGA 7 (Kumar S, et al., 2016), permitió conocer la naturaleza genética de los parásitos, para lo cual se construyó un dendrograma. En la construcción del dendrograma se usó la distancia proporcional (“distancia p”) a partir del alineamiento de los 101 SNPs usados para la descripción de la estructura de población del parásito. Para este análisis se eliminaron los loci con más de 30% de pérdidas, al igual que las muestras con más de 25% de datos sin resultados. El análisis final incluyó 71 loci (posiciones) y 121 muestras o secuencias de nucleótidos, incluyendo las muestras procedentes de Venezuela. Para la construcción del dendrograma se utilizó el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages) (Sneath PHA & Sokal RR, 1973). El cálculo de las “distancias p” se realizó con el método de máxima verosimilitud (Tamura K et al., 2004).

El dendrograma evidenció tres brazos principales, los cuales fueron denominados poblaciones A, B y C respectivamente. La “distancia p” promedio entre los tres brazos principales fue de 0,36 y la “distancia p” promedio al interior del brazo A fue de 0,07, al interior del brazo B de 0,02 y al interior del brazo C fue de 0,07. Las tres poblaciones (A, B y C) presentaron sub-poblaciones, 3 para A, 4 para B y 4 para C. Las subpoblaciones son casi idénticas entre sí, encontrándose mayores diferencias en el grupo de las subpoblaciones C, con un rango de diferencia de proporciones entre 0 y 0,15. Esta información se describe en la Figura 3-7.

**Figura 3-7:** Dendrograma de parásitos de *P. falciparum*. Cauca, 2014-2017.



En el dendrograma se evidenciaron tres brazos principales (poblaciones) señalados con las letras A, B y C, al interior de las cuales se identificaron diferentes sub-poblaciones casi idénticas entre sí, encontrándose mayores diferencias al interior de la población C.

## 3.4 Discusión

### 3.4.1 Perfil genético en genes asociados a resistencia a los antimaláricos evaluados

Una de las principales estrategias para el control y eliminación de la malaria es el tratamiento oportuno de los casos diagnosticados de esta enfermedad, pero el principal obstáculo para lograr esta meta es el surgimiento de resistencia a los antimaláricos. La primera fase en el desarrollo de resistencia es la aparición de mutaciones en genes específicos que le confieren ventajas al parásito, permitiéndole sobrevivir a pesar de la presencia del medicamento; la segunda fase corresponde a la selección y diseminación de poblaciones de parásitos resistentes al medicamento (WHO, 2011).

Los eventos genéticos que confieren resistencia a los antimaláricos son raros y ocurren de forma espontánea y al azar. En algunas oportunidades un único evento genético es suficiente para conferir la resistencia y en otros casos se requiere de la acumulación de múltiples eventos genéticos de origen independiente (Valderramos SG, et al., 2010).

Estudios epidemiológicos usando marcadores moleculares, han permitido identificar el origen y la diseminación de la resistencia a la cloroquina, los antifolatos, la mefloquina e incluso derivados de la artemisinina y la vigilancia permanente de estos eventos anticipa el surgimiento de resistencia o da lineamientos para cambios de esquemas terapéuticos con el fin de reducir la aparición de resistencia o la diseminación de la misma (Anderson T, et al., 2011).

En la década de 1940 se inició el uso de los medicamentos antimaláricos, lo cual fue crucial para el control de la malaria en el mundo. El amplio uso de estos medicamentos generó presión de selección en las poblaciones de *Plasmodium*, con la consecuente aparición y diseminación de la resistencia y el incremento en la morbi-mortalidad por malaria (Mita T, et al., 2009). En la actualidad se ha reportado resistencia de *P. falciparum* a todos los antimaláricos, incluyendo los derivados de la artemisinina (Haldar K, et al., 2018). Los primeros reportes de falla terapéutica a los antimaláricos, es decir, la ausencia de eliminación del parásito en la sangre o la falla en resolver el cuadro clínico asociado a la malaria después de la administración del medicamento, fue a la cloroquina, lo cual ocurrió a finales de la década de 1950 y de forma simultánea en dos zonas de baja transmisión: la frontera entre Camboya y Tailandia en el Sudeste Asiático

(Harinasuta T, et al., 1965) y en Colombia (Moore DV & Lanier JE, 1961) y para 1980 la resistencia a la cloroquina se había diseminado por todo el mundo (Takahashi N, et al., 2012). Este hecho obligó a la implementación de políticas estrictas en la vigilancia a los antimaláricos, lo que ha permitido detectar la reducción en la susceptibilidad de *P. falciparum* a derivados de la artemisinina en la Región del Gran Mekong y la confirmación de la resistencia a este medicamento en la frontera entre Camboya y Tailandia (WHO, 2011). Además del retraso en la eliminación del parásito en sangre, la presencia de mutaciones en el gen *kelch-13* definen la resistencia a la artemisinina (Haldar K, et al., 2018). Particularmente para Colombia, hasta el momento no se han informado casos de falla terapéutica ni mutaciones en el gen *kelch-13* asociadas con resistencia a los derivados de la artemisinina (Rojas-Alvarez DP, 2010; Montenegro M, et al., 2017; Aponte SL, et al., 2017; Pedreros MF, 2017).

En el presente estudio usando evaluación de SNPs en genes asociados a resistencia, se identificaron alelos mutantes en 20 de 24 posiciones de los 9 genes evaluados, algunas de ellas ampliamente diseminadas en Colombia y en el mundo, lo cual se traduce en la primera fase instaurada para el desarrollo de resistencia a los antimaláricos. Además se identificó una mutación reportada por primera vez en el país (CVIDT en *pfcr* 72-76), asociada a la resistencia a la cloroquina.

Aunque en el presente trabajo no se llevaron a cabo estudios de eficacia, las mutaciones identificadas están asociadas a falla a la respuesta terapéutica a los antimaláricos en Colombia y en el mundo, incluyendo genotipos de parásitos que podrían tener respuesta limitada a los derivados de la artemisinina (VDDNI en PGB).

### **3.4.2 Mutaciones en el gen *pfcr* asociadas a la resistencia a cloroquina**

El gen *pfcr* es el principal blanco en la resistencia a la cloroquina y la región de aminoácidos entre las posiciones 72 a 76 (CVMNK) es una de las más estudiadas en evaluaciones moleculares de resistencia. Estudios microsatelitales han permitido identificar cinco linajes parasitarios como origen de la resistencia: uno en Indochina/África, otro en Melanesia, dos en Suramérica (Brasil/Perú y Colombia/Ecuador) y finalmente uno en Filipinas (Wootton JC, et al., 2002; Chen N, et al., 2003). El haplotipo triple mutante CVIET es el de mayor distribución en África y en Asia, mientras que el

haplotipo SVMNT está mejor representado en Suramérica (Sá JM, et al., 2009). Particularmente en Brasil, Perú y la Melanesia se han reportado los haplotipos CVIET, SVMNT, CVMNT y CVMET (Wootton JC, et al., 2002; Chen N, et al., 2003) con mutaciones en alguna de las cinco posiciones (72 a 76). Otros haplotipos identificados son SVMIT y RVMNT en Guyana (Best Plummer W, et al., 2004), SVIET en Papúa, Indonesia (Nagesha HS, et al., 2003), SVMDT y CVMDT en Filipinas (Hatabu T, et al., 2009), CVMNN en Indonesia (Huaman MC, et al., 2004), CVTNT en Camboya (Lim P, et al., 2003), y CVIDT en Madagascar (Randrianarivelosia M, et al., 2006), India (Awasthi G, et al., 2011) y Camboya (Lim P, et al., 2003). Específicamente para Colombia los haplotipos descritos con mayor frecuencia, incluyendo los resultados del presente estudio, se presentan en la Tabla 3-6.

Posterior al surgimiento de resistencia a la cloroquina en Colombia en 1959, las políticas nacionales recomendaron el uso de este medicamento en combinación sulfadoxina-pirimetamina para el manejo de la malaria no complicada por *P. falciparum*, pero los niveles de fallas terapéuticas superiores a 90% obligaron a suspender su uso en el país a partir de 1999 (Ministerio de Salud, 2000). Posterior a esto, estudios *in vitro* han demostrado aumento de la susceptibilidad entre 2011 y 2017 en cepas del parásito procedentes de Tumaco (Aponte SL, et al., 2011; Aponte SL, et al., 2017), aunque en presencia de la mutación K76I (Aponte SL, et al., 2017) lo cual podría estar relacionado con cambios genéticos del parásito en posiciones diferente de *pfcr*t o incluso en otros genes que podrían estar modulando la respuesta a este medicamento (Gabryszewski SJ, et al., 2016).

**Tabla 3-6:** Genotipos en el gen *pfcr*t asociados a la resistencia a la cloroquina identificados en Colombia.

Haplotipo	Frecuencia n (%)	Procedencia	Periodo de recolección	Referencia
<u>K76I</u>	83/83 (100)	Región Pacífica	1995-1999	González IJ, et al., 2003
<u>K76I</u>	111/111 (100)	Región Pacífica (Tumaco, Nariño), Urabá-Bajo Cauca (Córdoba), Amazonía (Guaviare)	2009-2012	Aponte SL, et al., 2017



**Tabla 3-6:** (Continuación)

Haplotipo	Frecuencia n (%)	Procedencia	Periodo de recolección	Referencia
CVMNT <sup>α</sup>	1/15 (6,7)	Región Pacífica	1999-2001	Echeverry DF, et al., 2007
	6/87 (6,9)	Región Pacífica (Guapi, Cauca)	2014-2015	Pedrerros MF, 2017
CMNT <sup>β</sup>	115/172 (67)	Urabá-Bajo Cauca (Antioquia)	2002-2004	Restrepo E, et al., 2008
CMET <sup>β</sup>	1/1 (100)	Región Pacífica Norte	1999	Vieira PP, et al., 2004
CVMET <sup>α</sup>	12/15 (80)	Región Pacífica	1999-2001	Echeverry DF, et al., 2007
	79/87 (90,8)	Región Pacífica (Guapi, Cauca)	2014-2015	Pedrerros MF, 2017
SVMNT <sup>α</sup>	2/87 (2,3)	Región Pacífica (Guapi, Cauca)	2014-2015	Pedrerros MF, 2017
SMNT <sup>β</sup>	20/172 (12)	Urabá-Bajo Cauca (Antioquia)	2002-2004	Restrepo E, et al., 2008
CVIET <sup>α</sup>	1/15 (6,7)	Región Pacífica	1999-2001	Echeverry DF, et al., 2007
	2/8 (25)	Región Pacífica (Guapi, Cauca)	2014-2017	Presente estudio
CVIDT <sup>α</sup>	6/8 (75)	Región Pacífica (Guapi, Cauca)	2014-2017	Presente estudio
SMET <sup>β</sup>	15/172 (9)	Urabá-Bajo Cauca (Antioquia)	2002-2004	Restrepo E, et al., 2008

$\alpha$  = posiciones evaluadas 72-73-74-75-76.  $\beta$  = posiciones evaluadas 72-74-75-76

En el presente estudio, en muestras procedentes de zona rural de Guapi, Cauca y zona rural de Nariño se describió el haplotipo CVIDT (75%, 6/8), identificado por primera vez en Colombia y CVIET (25%, 2/8), reportado previamente en la misma región del país (Echeverry DF, et al., 2007). La aparición de un nuevo genotipo podría ser explicado por la aparición “*de novo*” o debido a la movilidad humana relacionada con la actividad económica o el desplazamiento por la violencia, lo cual es evidente, pues a pesar de las dificultades que existen en el acceso a la región y el relativo aislamiento geográfico, se identificaron pacientes procedentes del departamento de Nariño, del mismo departamento de Cauca e incluso de países vecinos que asistieron a alguno de los puestos de diagnóstico de malaria, siendo el puesto ubicado en el casco urbano de Guapi el principal receptor de individuos de diferentes orígenes. Es importante destacar, como se presenta en la Tabla 3-6, que solo hay tres estudios que evalúan las posiciones 72 a 76 en *pfcr*t en Colombia y posiblemente solo hasta ahora se detectó una mutación que ya estaba presente en la población de parásitos. Valdría la pena aclarar el origen del haplotipo mutante usando otro tipo de herramienta como los estudios con microsatélites. Además es importante resaltar, como se mencionó anteriormente, que el haplotipo CVIDT ha sido reportado en países asiáticos y africanos (Awasthi G & Das A, 2013).

Todos los estudios llevados a cabo en Colombia han reportado el alelo silvestre en la posición V73 en el gen *pfcr*t, mientras que la mutación 76I se ha fijado en todas las poblaciones parasitarias del país. Además, es evidente la presencia de parásitos mutantes para este gen en dos de las regiones con mayor riesgo de transmisión de malaria, pero con ecosistemas diferentes, la Región Pacífica y el Urabá-Bajo Cauca. Es importante recordar que uno de los orígenes geográficos del genotipo asociado a la resistencia a la cloroquina fue Colombia (Wootton JC, et al., 2002; Payne D, 1987) y que esto, sumado al alto porcentaje de fallas terapéuticas obligó al cambio de esquema de tratamiento dirigido al manejo de la malaria no complicada por *P. falciparum* como política nacional en el año 1999 (Ministerio de Salud, 2000). Este medicamento se usa actualmente para el tratamiento de la malaria no complicada por *P. vivax* en Colombia (Ministerio de la Protección Social, 2010) y su venta es libre en la mayoría de las farmacias locales en el país, lo cual facilita de alguna manera la auto-medicación y el mantenimiento de la presión de selección de este fármaco en cepas de *P. falciparum*. En Malawi, África se ha informado el resurgimiento de parásitos sensibles a la cloroquina como efecto de la reversión de la mutación K76I al alelo silvestre, como consecuencia

de la suspensión absoluta del uso de este medicamento en la región desde 1993. Su reintroducción, en combinación con otro antimalárico, es considerada actualmente como una potencial estrategia en la lucha contra la malaria en ese país (Frosch AE, et al., 2014).

### 3.4.3 Mutaciones en el gen *pfdhfr* asociadas a la resistencia a pirimetamina

Los primeros reportes de falla terapéutica a la pirimetamina en el mundo se informaron en la frontera entre Camboya y Tailandia en la década de 1960; a mediados de esta década se confirmó la resistencia en Brasil, en 1977 en Venezuela y en 1981 en Colombia (Mita T, et al., 2009).

La resistencia a la pirimetamina requiere de la presencia de mutaciones no sinónimas que se acumulan de manera jerárquica en cuatro posiciones (51, 59, 108 y 164) del gen *pfdhfr* (Gregson A & Plowe CV, 2005). La mutación S108N produce un nivel de resistencia inicial, el cual se incrementa con la acumulación de las mutaciones en N51I o C59R y los máximos niveles de resistencia se identifican con la adición de la mutación I164L (Gregson A & Plowe CV, 2005; Hyde JE, et al., 2008). En la Región de las Américas desde la década de los años 80 y particularmente en la Amazonía se han identificado parásitos portadores de mutaciones triples (N51I, S108N y I164L) asociadas con niveles altos de resistencia y a partir de 2006 se ha identificado el mutante triple C50R, N51I y S108N. Este último genotipo mutante también fue identificado en Venezuela (OPS, 2012) y por análisis de los marcadores microsatélites se confirmó que estos dos alelos mencionados anteriormente tenían dos orígenes independientes en la región (Mita T, et al., 2009; OPS, 2012).

Los alelos silvestres CNCSI (posiciones 50, 51, 59, 108, 164) y NCSI (posiciones 51, 59, 108, 164) fueron identificados previamente en la Región Pacífica colombiana con frecuencias entre 20,7% y 66,7% (Corredor V, et al., 2010; Hernández DC, et al., 2013; Pedreros MF, 2017), siendo las frecuencias reportadas en Guapi las más bajas en el país, como se evidencia en el presente estudio, en el cual el porcentaje del alelo silvestre NCSI fue de 28,8%.

Como se mencionó, la acumulación de mutaciones en este gen es clave en el incremento de resistencia a la pirimetamina. En Colombia se han identificado mutaciones simples,

dobles y triples. No se han reportado cuádruples mutantes hasta el momento. En el país, diversos estudios desde 1998 reportan que la mutación simple S108N es la más prevalente y su frecuencia se ha incrementado con el tiempo (Giraldo LE, et al., 1998; Chaparro J, et al., 2000; Méndez F, et al., 2002; Schimider N, et al., 2003; Galindo JA, et al., 2010; Corredor V, et al., 2010; Hernandez DC, et al., 2013; Pedreros MF, 2017); en el presente estudio esta mutación se identificó en 58% de los casos (116/201) y 1% (3/201) de los casos presentó la mutación S108I, estos últimos procedentes de zona rural de Timbiquí, Cauca. La mutación S108I, asociada con la resistencia al proguanil y su metabolito intermediario el cicloguanil, fue descrita previamente en Colombia con una frecuencia de 25% (3/12) en Nariño (incluyendo Tumaco), 14% (1/7) en Caquetá y 11% (3/27) en el Valle del Cauca (incluyendo Buenaventura) (Giraldo LE, et al., 1998). Un estudio reciente identificó además la mutación A16V (asociada con la resistencia del cicloguanil), en muestras procedentes de Tumaco, Nariño recolectadas entre 2012 y 2013, en una frecuencia de 23,5% (8/35) (Fierro BH, 2017).

Las mutaciones dobles son más frecuentes en la Orinoquía, la Amazonía y la Región Pacífico Norte, mientras que los triples mutantes son más frecuentes en la Amazonía. Triples y dobles mutantes son poco frecuentes en la Región Pacífico Sur. El doble mutante N51I, C59, S108N y I164 es el más frecuente en el país y se observan cambios en su presentación de acuerdo con la región y el año de evaluación; antes de 2006, en la zona sur de la Región Pacífica tuvo una frecuencia de 9,5% y no fue identificado nuevamente después de 2006; en la zona norte de la Región Pacífica se presentó en un porcentaje de 93%, proporción que se mantuvo antes y después de 2006; en la Orinoquía se informó con una frecuencia de 95% proporción que también se mantuvo antes y después de 2006 y en la Amazonía, antes de 2006 se presentó con una frecuencia de 6,3%, la cual se incrementó a 73,1% después de este año (Corredor V, et al., 2010); en Tierralta (Región de Urabá-Bajo Cauca) en 2006 se presentó en 100% de los casos; en Tumaco (Región Pacífico Sur) entre 2007 y 2008 tuvo una frecuencia de 40% (Hernández DC, et al., 2013) y de 4,6% específicamente en Guapi, Cauca entre 2014 y 2015 (Pedreros MF, 2017). El presente estudio identificó una frecuencia de 46,2% (61/132) del doble mutante N51I, C59, S108N y I164, lo cual evidencia un aumento en la proporción de esta mutación en la región. El triple mutante N51I, C59, S108N y I164L, se ha reportado en la región de la Amazonía con una frecuencia de 81,3% después de no haber sido identificado antes de 2006 (Corredor V, et al., 2010), mientras que el triple

mutante C50R, N51I, C59, S108N y I164 se reportó en Guapi, Cauca en 2015 en una frecuencia de 2,3% (Pedreros MF, 2017), en una muestra procedente de Venezuela. Estos datos concuerdan con el origen del triple mutante (N51I, C59, S108N y I164L) en Brasil y del triple mutante (C50R, N51I, C59, S108N y I164) en Venezuela (OPS, 2012). En el presente estudio no se identificaron triples mutantes, lo cual coincide con la historia previa de susceptibilidad a la pirimetamina y con la presencia de dobles mutantes en la región.

Se puede concluir entonces que existe un aumento del doble mutante en Región Pacífica sur. Esto indica que persiste la presión de selección sobre la pirimetamina a pesar de que este medicamento fue retirado en 2007 de los esquemas oficiales para el tratamiento de la malaria por *P. falciparum* en Colombia (Ministerio de la Protección Social, 2010). Posiblemente este medicamento no sería candidato como quimioprofiláctico en casos especiales, similar a lo que ocurre en otros lugares del mundo (WHO, 2015) y difícilmente podría ser usado nuevamente y ser reintroducido de forma oficial en los esquemas terapéuticos. Adicionalmente, los cambios genéticos probablemente estén acompañados de otros procesos adaptativos del parásito (*fitness*) que afecten de diversa forma (susceptibilidad vs resistencia) la respuesta a otros antimaláricos, producto de la aparición de mutaciones compensatorias.

Los haplotipos descritos con mayor frecuencia para *pfdhfr* en Colombia, incluyendo los resultados del presente estudio, se presentan en la Tabla 3-7.

**Tabla 3-7:** Genotipos en el gen *pfdhfr* asociados a la resistencia a la pirimetamina identificados en Colombia.

Haplotipo	Frecuencia %	Procedencia	Periodo de recolección	Referencia
°CNCSI (s)	20,7	Región Pacífica (Guapi, Cauca)	2014-2015	Pedreros MF, 2017
®NCSI (s)	61,9	Región Pacífica Sur	Antes de 2006	Corredor V, et al., 2010
	66,7	Región Pacífica Sur	Después de 2006	Corredor V, et al., 2010
	35	Región Pacífica (Tumaco, Nariño)	2007-2008	Hernández DC, et al., 2013
	28,8	Región Pacífica (Guapi, Cauca)	2014-2017	Presente estudio
°ANCSI (s)	26,5	Región Pacífica (Tumaco, Nariño)	2012-2013	Fierro BH, 2017

**Tabla 3-7:** (Continuación)

Haplotipo	Frecuencia %	Procedencia	Periodo de recolección	Referencia
PNCNI	12,5	Amazonía	Antes de 2006	Corredor V, et al., 2010
	4,6	Orinoquía	Antes de 2006	Corredor V, et al., 2010
	7,1	Región Pacífica Norte	Antes de 2006	Corredor V, et al., 2010
	28,6	Región Pacífica Sur	Antes de 2006	Corredor V, et al., 2010
	26,9	Amazonía	Después de 2006	Corredor V, et al., 2010
	5,9	Orinoquía	Después de 2006	Corredor V, et al., 2010
	6,7	Región Pacífica Norte	Después de 2006	Corredor V, et al., 2010
	33,3	Región Pacífica Sur	Después de 2006	Corredor V, et al., 2010
	25	Región Pacífica (Guapi, Cauca)	2014-2017	Presente estudio
°CNCNI	72,4	Región Pacífica (Guapi, Cauca)	2014-2015	Pedrerros MF, 2017
YVNCNI	23,5	Región Pacífica (Tumaco, Nariño)	2012-2013	Fierro BH, 2017
YANCNI	8,8	Región Pacífica (Tumaco, Nariño)	2012-2013	Fierro BH, 2017
PNCNI	6,3	Amazonía	Antes de 2006	Corredor V, et al., 2010
	95,5	Orinoquía	Antes de 2006	Corredor V, et al., 2010
	92,9	Región Pacífica Norte	Antes de 2006	Corredor V, et al., 2010
	9,5	Región Pacífica Sur	Antes de 2006	Corredor V, et al., 2010
	73,1	Amazonía	Después de 2006	Corredor V, et al., 2010
	94,1	Orinoquía	Después de 2006	Corredor V, et al., 2010
	93,3	Región Pacífica Norte	Después de 2006	Corredor V, et al., 2010
	0	Región Pacífica Sur	Después de 2006	Corredor V, et al., 2010
	46,2	Región Pacífica (Guapi, Cauca)	2014-2017	Presente estudio
°CNCNI	4,6	Región Pacífica (Guapi, Cauca)	2014-2015	Pedrerros MF, 2017
YAICNI	38,2	Región Pacífica (Tumaco, Nariño)	2012-2013	Fierro BH, 2017
	100	Región Pacífica (Quibdó, Chocó)	2012-2013	Fierro BH, 2017
	100	Bajo Cauca-Alto Sinú (Tierralta)	2012-2013	Fierro BH, 2017

**Tabla 3-7:** (Continuación)

Haplotipo	Frecuencia %	Procedencia	Periodo de recolección	Referencia
<sup>β</sup> <u>ICNL</u> *	81,3	Amazonía	Antes de 2006	Corredor V, et al., 2010
<sup>α</sup> <u>RICNI</u>	2,3	Región Pacífica (Guapi, Cauca)	2014-2015	Pedrerros MF, 2017
<sup>γ</sup> <u>VICNI</u>	2,9	Región Pacífica (Tumaco, Nariño)	2012-2013	Fierro BH, 2017

<sup>α</sup> = posiciones evaluadas 50, 51, 59, 108, 164

<sup>β</sup> = posiciones evaluadas 51, 59, 108, 164

<sup>γ</sup> = posiciones evaluadas 16, 51, 108, 164

\*En el estudio de Corredor V et al., 2010 este genotipo no fue identificado en ninguno de los otros lugares antes ni después de 2006, al igual que en la Amazonía después de 2006.

### 3.4.4 Mutaciones en el gen *pf dhps* asociadas a la resistencia a sulfadoxina

La resistencia a la sulfadoxina-pirimetamina se registró por primera vez nuevamente en la frontera entre Camboya y Tailandia a finales de 1970 y los alelos mutantes en *pf dhps* asociados a la resistencia a la sulfadoxina tienen múltiples orígenes en el mundo (Vinayak S, et al., 2010).

Una variedad de combinaciones de mutaciones en las posiciones 436, 437, 540, 581 y 613 del gen *pf dhps* confieren resistencia a la sulfadoxina. Algunas de estas mutaciones están delimitadas geográficamente y otras están ampliamente diseminadas en el mundo (Gregson A & Plowe CV, 2005). La mutación inicial necesaria para el desarrollo de resistencia a la sulfadoxina es A437G, posterior a la cual siguen las mutaciones A581G, S436A, K540E y A613S que se asocian con niveles altos de resistencia a este medicamento (Gregson A & Plowe CV, 2005).

En la Región de las Américas la triple mutación A437G, K540E y A581G identificada en Perú, Venezuela y Brasil está relacionada con niveles altos de resistencia a la sulfadoxina (OPS, 2012).

En Colombia la mutación A437G, se ha reportado desde 1999 y se identifican frecuencias altas de más de 80%; esta mutación es más frecuente en la Orinoquía y en el Urabá-Bajo Cauca (frecuencias mayores a 80%) (Galindo JA, et al., 2010; Corredor V, et al., 2010); con frecuencias intermedias en la zona norte de la Región Pacífica (16 a 65%)

(Méndez F, et al., 2002; Corredor V, et al., 2010) y en la zona sur no se había identificado (Corredor V, et al., 2010), hasta que entre 2007 y 2008 se reportó una frecuencia de 17,5% en Tumaco (Hernández DC, et al., 2013) y posteriormente de 75,3% en Guapi, Cauca entre 2014 y 2015 (Pedreros MF, 2017). En el presente estudio, en la posición 437 de este gen se identificó 52% (101/196) de mutantes A437G, infección múltiple en 1% (2/196) de los casos y el alelo silvestre en 47% (93/196) de los casos.

En el país, el doble mutante en *pf dhps* A437G, K540 y A581G, se identificó en la Amazonía y la Orinoquía (35,3 y 5,5% respectivamente) antes de 2006 (Corredor V, et al., 2010), en la Orinoquía después de 2006 (11,8%) (Corredor V, et al., 2010) y en el presente estudio con una frecuencia de 5,5%. El doble mutante S436F, A437G, K540, A581 y A613 se identificó en Guapi, Cauca entre 2014 y 2015 con una frecuencia de 2,7% (2/73) (Pedreros MF, 2017). El triple mutante A437G, K540E y A581G se informó en la Amazonía y la Orinoquía antes de 2006 (47,1 y 5,5% respectivamente) y posterior a este año en la Amazonía (57,7%); este mutante no fue reportado en la Región Pacífica antes ni después de 2006 (Corredor V, et al., 2010). El triple mutante S436, A437G, K540E, A581G y A613 fue informado en Guapi, Cauca entre 2014 y 2015 (1,4%, 1/73), en una muestra procedente de Venezuela, lo cual concuerda con el origen de esta mutación en el oriente del país (Pedreros MF, 2017). En el presente estudio no se identificaron triples mutantes. Estos datos se presentan en la Tabla 3-8.

En el país no se han identificado cuádruples mutantes para *pf dhps* hasta el momento. Por otra parte, la vigilancia de los marcadores moleculares de resistencia sugiere la evaluación de la presencia de un quintuple mutante en las posiciones 51, 59 y 108 en *pf dhfr* y en 437 y 540 en *pf dhps* como un buen predictor de falla terapéutica a la sulfadoxina-pirimetamina (Picot S, et al., 2009). En Colombia, en muestras recolectadas entre 2002 y 2004 se identificó el triple mutante N51I, S108N (*pf dhfr*) más A437G, (*pf dhps*) en 90% (9/10) en muestras del Guaviare, en 100% (10/10) en muestras de la Orinoquía y en 100% (10/10) y 70% (7/10) en dos localidades del Bajo Cauca-Alto Sinú, Puerto Libertador y Tierralta en Córdoba; en ese mismo estudio se identificó el cuádruple mutante N51I, S108N (*pf dhfr*) más A437G, K540E (*pf dhps*) en 20% (2/10) en la Orinoquía (Galindo JA, et al., 2010). Por otra parte en Guapi, Cauca entre 2014 y 2015, se identificó un séxtuple mutante, utilizando asociación multilocus, C50R, N51I, C59, S108N y I164 (*pf dhfr*) más S436, A437G, K540E, A581G y A61 (*pf dhps*) en una frecuencia superior a 10% (Pedreros MF, 2017). Los haplotipos descritos con mayor



frecuencia para *pdfhps* en Colombia, incluyendo los resultados del presente estudio, se presentan en la Tabla 3-8.

**Tabla 3-8:** Genotipos en el gen *pdfhps* asociados a la resistencia a la sulfadoxina identificados en Colombia.

Haplotipo	Frecuencia (%)	Procedencia	Periodo de recolección	Referencia
αSAKAA (s)	4	Bajo Cauca-Alto Sinú (Tierralta)	2012-2013	Fierro BH, 2017
	20,6	Región Pacífica (Guapi, Cauca)	2014-2015	Pedrerros MF, 2017
	71,4	Región Pacífica (Guapi, Cauca)	2014-2017	Presente estudio
βAKA (s)	11,8	Amazonía	Antes de 2006	Corredor V, et al., 2010
	5,3	Orinoquía	Antes de 2006	Corredor V, et al., 2010
	35,7	Región Pacífica Norte	Antes de 2006	Corredor V, et al., 2010
	100	Región Pacífica Sur	Antes de 2006	Corredor V, et al., 2010
	30,8	Amazonía	Después de 2006	Corredor V, et al., 2010
	0	Orinoquía	Después de 2006	Corredor V, et al., 2010
	33,3	Región Pacífica Norte	Después de 2006	Corredor V, et al., 2010
	100	Región Pacífica Sur	Después de 2006	Corredor V, et al., 2010
	22,3	Región Pacífica (Tumaco, Nariño)	2007-2008	Hernández, 2013
βGKA	5,9	Amazonía	Antes de 2006	Corredor V, et al., 2010
	84,2	Orinoquía	Antes de 2006	Corredor V, et al., 2010
	64,3	Región Pacífica Norte	Antes de 2006	Corredor V, et al., 2010
	0	Región Pacífica Sur	Antes de 2006	Corredor V, et al., 2010
	11,5	Amazonía	Después de 2006	Corredor V, et al., 2010
	88,2	Orinoquía	Después de 2006	Corredor V, et al., 2010
	66,7	Región Pacífica Norte	Después de 2006	Corredor V, et al., 2010
	0	Región Pacífica Sur	Después de 2006	Corredor V, et al., 2010
	17,5	Región Pacífica (Tumaco, Nariño)	2007-2008	Hernández, 2013
69,6	Bajo Cauca-Alto Sinú (Tierralta)	2007-2008	Hernández, 2013	
αSGKAA	10,3	Región Pacífica (Quibdó, Chocó)	2012-2013	Fierro BH, 2017
	75,3	Región Pacífica (Guapi, Cauca)	2014-2015	Pedrerros MF, 2017
	23,1	Región Pacífica (Guapi, Cauca)	2014-2017	Presente estudio
αFAKAA	60	Región Pacífica (Tumaco, Nariño)	2012-2013	Fierro BH, 2017
	31	Región Pacífica (Quibdó, Chocó)	2012-2013	Fierro BH, 2017
	88	Bajo Cauca-Alto Sinú (Tierralta)	2012-2013	Fierro BH, 2017

α= posiciones evaluadas 436, 437, 540, 581,613

β = posiciones evaluadas 437, 540, 581

Tabla 3-8: (Continuación)

Haplotipo	Frecuencia (%)	Procedencia	Periodo de recolección	Referencia
$\beta$ GKG	35,3	Amazonía	Antes de 2006	Corredor V, et al., 2010
	5,3	Orinoquía	Antes de 2006	Corredor V, et al., 2010
	0	Región Pacífica Norte	Antes de 2006	Corredor V, et al., 2010
	0	Región Pacífica Sur	Antes de 2006	Corredor V, et al., 2010
	0	Amazonía	Después de 2006	Corredor V, et al., 2010
	11,8	Orinoquía	Después de 2006	Corredor V, et al., 2010
	0	Región Pacífica Norte	Después de 2006	Corredor V, et al., 2010
	0	Región Pacífica Sur	Después de 2006	Corredor V, et al., 2010
$\alpha$ FGKAA	40	Región Pacífica (Tumaco, Nariño)	2012-2013	Fierro BH, 2017
	58,6	Región Pacífica (Quibdó, Chocó)	2012-2013	Fierro BH, 2017
	8	Bajo Cauca-Alto Sinú (Tierralta)	2012-2013	Fierro BH, 2017
	2,7	Región Pacífica (Guapi, Cauca)	2014-2015	Pedreros MF, 2017
$\alpha$ SGNAA	5,5	Región Pacífica (Guapi, Cauca)	2014-2017	Presente estudio
$\beta$ GEG	47,1	Amazonía	Antes de 2006	Corredor V, et al., 2010
	5,3	Orinoquía	Antes de 2006	Corredor V, et al., 2010
	0	Región Pacífica Norte	Antes de 2006	Corredor V, et al., 2010
	0	Región Pacífica Sur	Antes de 2006	Corredor V, et al., 2010
	57,7	Amazonía	Después de 2006	Corredor V, et al., 2010
	0	Orinoquía	Después de 2006	Corredor V, et al., 2010
	0	Región Pacífica Norte	Después de 2006	Corredor V, et al., 2010
	0	Región Pacífica Sur	Después de 2006	Corredor V, et al., 2010
$\alpha$ SGEGA	1,4	Región Pacífica (Guapi, Cauca)	2014-2015	Pedreros MF, 2017

$\alpha$ = posiciones evaluadas 436, 437, 540, 581,613

$\beta$  = posiciones evaluadas 437, 540, 581

Los datos observados tanto para *pfdhfr* como para *pfdhps*, evidencian diferencias dependiendo del contexto ecológico y epidemiológico de la región estudiada en Colombia. Se podría pensar que la diseminación de las mutaciones ha sido más lenta y restringida en el sur occidente del país, posiblemente relacionado con el relativo aislamiento geográfico, aunque la identificación de un triple mutante en *pfdhfr* procedente de Venezuela alerta sobre el riesgo de la introducción de un nuevo genotipo en la región. Es difícil pensar que la presión de selección por la combinación sulfadoxina-pirimetamina sea causa del aumento en la proporción de los dobles y triples mutantes en la región y que su aparición se relacione con este hecho. Es importante recordar que este medicamento, usado para el tratamiento de la malaria no complicada por *P. falciparum* en asociación con cloroquina o amodiaquina, se suspendió de forma oficial en Colombia a partir de 2007 (Ministerio de la Protección Social, 2010), aunque su uso se extendió por varios años más en algunas regiones del país mientras se abastecían completamente de las combinaciones con derivados de artemisinina instauradas como primera línea terapéutica en esa época; además la comercialización de este medicamento no es tan frecuente en las farmacias locales en Colombia como lo es para la cloroquina. Aunque se recomienda el uso de la combinación sulfadoxina-pirimetamina para el manejo de la Toxoplasmosis por contener pirimetamina, sustancia activa indicada en el manejo de esta parasitosis, es difícil de obtener este medicamento en Colombia, incluso en estos casos. Sin embargo, el uso de antibióticos como el trimetropin-sulfametoxazol, que también interfiere en la síntesis del ácido fólico, al igual que la combinación sulfadoxina-pirimetamina y que además es de venta libre en muchas farmacias locales del país, se usa de forma indiscriminada para el manejo de cuadros febriles y podría ejercer algún tipo de presión de selección en las poblaciones de *P. falciparum*.

Por otra parte, el proguanil no ha sido usado en los esquemas oficiales para el tratamiento de la malaria no complicada por *P. falciparum* en Colombia, pero fue evaluado en un ensayo clínico que comparó la eficacia de combinaciones farmacológicas con derivados de la artemisinina como artemeter-lumefantrina, atovaquona-proguanil y artesunato-mefloquina con resultados de eficacia para las tres combinaciones superiores a 98% (Carrasquilla G, et al., 2012). El hallazgo de la mutación S108I en *pfdhfr* relacionada con la resistencia al proguanil podría estar asociada con la selección de poblaciones de *P. falciparum* resistentes como producto del uso de otros antifolatos usados para el manejo de diversas enfermedades infecciosas bacterianas, como se

mencionó anteriormente. En relación con estos hallazgos, un estudio previo realizado en muestras procedentes de Tumaco, Nariño identificó la mutación A16V en *pfdhfr* (Fierro BH, 2017) la cual está asociada con resistencia al cicloguanil (metabolito activo del proguanil) (WHO, 2011), lo cual refuerza la hipótesis de selección cruzada relacionada con el uso de otros antifolatos en la región.

### **3.4.5 Mutaciones en el gen *pfexo* asociadas a la resistencia a piperaquina**

La presencia de la mutación E415G en el gen *pfexo* está asociada con la resistencia a la piperaquina (Amato R, et al., 2017), medicamento que hace parte de una de las combinaciones con derivados de la artemisinina (dihidroartemisinina) utilizados como primera línea de elección en el tratamiento de la malaria no complicada por *P. falciparum* en algunas partes del mundo (WHO, 2015).

El presente estudio corresponde a la primera evaluación en este gen que se realiza en el país. La mayor frecuencia de genotipos identificados fueron silvestres (99%, 193/194) y se encontró un individuo con mas de un alelo en la posición evaluada (es decir, una posible infección múltiple), lo cual hace pensar en una posible mutación.

La piperaquina, esquizonticida sanguíneo de vida media prolongada que nunca ha sido usado en Colombia en los esquemas oficiales para el tratamiento de la malaria, fue usada en China durante muchos años, hasta que en la década de los 80 se reportó resistencia, por lo cual se sugirió su uso combinado con derivados de la artemisinina; en la actualidad se encuentra en una combinación fija con la dihidroartemisinina (Davis TM, et al., 2005). La piperaquina es un medicamento del tipo quinolínico, como la cloroquina, la amodiaquina y la mefloquina que sí fueron usadas en Colombia como parte de los esquemas antimaláricos oficiales hasta el año 2007 (Ministerio de la Protección Social, 2010), lo cual podría explicar la presencia de una posible mutación en el gen que evalúa la resistencia a este fármaco, debido a selección cruzada con estos antimaláricos.

### 3.4.6 Mutaciones en el gen *pfmdr1* asociadas a la resistencia/susceptibilidad a cloroquina, amodiaquina, lumefantrina y mefloquina

El gen *pfmdr1* es considerado el gen de resistencia a múltiples medicamentos antimaláricos como la mefloquina, la lumefantrina y la amodiaquina, entre otros, los cuales hacen parte de las combinaciones farmacológicas con derivados de la artemisinina; este gen además es modulador de la respuesta a la cloroquina. Mutaciones en las posiciones 86, 184 y 1246 podrían estar asociadas con modificaciones en la respuesta a estos medicamentos (Malmberg M, et al., 2013). Se han identificado cinco mutaciones con un patrón de distribución característico a nivel mundial. Las mutaciones amino terminales (N86Y y Y184E) son más comunes en los parásitos de origen asiático y africano, mientras que las tres mutaciones carboxi terminales (S1034C, N1042D y D1246Y) se encuentran con mayor frecuencia en aislados de Suramérica (Veiga MI, et al., 2016).

En la Región de las Américas, en Perú se han observado mutaciones en las posiciones Y184E y N1042D y por análisis con microsatélites se ha podido evidenciar orígenes diferentes en los mutantes entre las regiones Amazónica oriental y occidental en este país (Bacon DJ, et al., 2009; Griffing SM, et al., 2010). En Venezuela entre 2003 y 2004 se reportó la presencia del triple (Y184E, N1042D y D1246Y) y el cuádruple mutante (Y184E, S1034C, N1042D y D1246Y) con frecuencias de 37% y 63% respectivamente (Griffing SM, et al., 2010). En Brasil el haplotipo identificado con más frecuencia fue N86, Y184E, S1034C y D1246Y (Viana GM, et al., 2006).

Mientras que en el presente estudio el alelo silvestre en la posición 86 estuvo presente en 100% (64/64) de las muestras analizadas, en estudios previos realizados en muestras procedentes de la Región Pacífica recolectadas entre 1999 y 2000 la mutación N86Y fue identificada en 6,7% (1/15) (Echeverry DF, et al., 2007). Es interesante observar que esta misma mutación fue identificada en 5,5% (4/73) muestras recolectadas entre 2002 y 2004, con respuesta adecuada al tratamiento con mefloquina en el municipio de Turbo, Antioquia; en el mismo estudio, 14,2% (20/141) el alelo silvestre fue hallado en muestras de individuos con falla a este mismo tratamiento procedentes del Urabá-Bajo Cauca antioqueño y el alelo silvestre también fue identificado en 100% de individuos con malaria complicada procedentes de Tumaco (Montoya P, et al., 2007). El alelo silvestre en esta posición también fue identificado en todas las muestras analizadas procedentes de

Guaviare (4), Córdoba (6) y Nariño (3) recolectadas entre 2009 y 2012 (Aponte SL, et al., 2017). Estos hallazgos sugieren que la distribución del genotipo mutante N86Y en *pfmdr1* es diferente entre la Región Pacífico Sur y el Urabá-Bajo Cauca y podría estar en relación con el uso previo de la combinación mefloquina-artesunato en el Urabá-Bajo Cauca antioqueño como inicio en la implementación de derivados de la artemisinina en Colombia (Ministerio de la Protección Social, 2010). Es importante recordar que ésta es una mutación compensadora de la pérdida de la adaptabilidad de parásitos portadores de la mutación K76I en *pfcr1*, relacionada con la resistencia a la cloroquina (Mita T, et al., 2009).

La mutación Y184E, identificada por Aponte S y colaboradores (Aponte SL, et al., 2017) y Echeverry D y colaboradores (Echeverry DF, et al., 2007) en el 100% de las muestras analizadas, se encontró en 87% (75/86) de las muestras analizadas en el presente estudio. La mutación D1246Y fue identificada en Turbo, Urabá antioqueño en 87,7% (64/73) de las muestras, en el bajo Cauca en 97% (66/68) de las muestras y en Tumaco, Nariño en 22,4% (20/89) (Montoya P, et al., 2007). Esta misma mutación fue identificada en Guaviare en 100% (4/4), Córdoba en 100% (6/6) y no se identificó en Tumaco, Nariño (Aponte SL, et al., 2017). Por otra parte, Echeverry D y colaboradores (Echeverry DF, et al., 2007) identificó esta mutación en 53,3% (8/15) de las muestras analizadas. En el presente estudio, esta mutación fue identificada en 37,3% (76/204). Estos hallazgos sugieren que esta última mutación está ampliamente distribuida en la región del Urabá-Bajo Cauca y su frecuencia es mucho menor en la Región Pacífica colombiana.

En el presente estudio, en la evaluación de las posiciones 86, 184 y 1246 del gen *pfmdr1* se identificaron mutaciones simples NFD (52,9%, 27/51), NYY (2%, 1/51) y dobles NFY (45,1%, 23/51). Echeverry D y colaboradores también identificó el simple mutante NFD en 40% (6/15) y el doble mutante NFY en 53,3% (8/15) en muestras procedentes de la Región Pacífica recolectadas entre 1999 y 2000 (Echeverry DF, et al., 2007). Los haplotipos para *pfmdr1* descritos con mayor frecuencia en Colombia, incluyendo los resultados del presente estudio, se presentan en la Tabla 3-9.

Es importante enfatizar que estudios de ingeniería genética en el gen *pfmdr1* han demostrado que la mutación N86Y, la cual es bastante frecuente en África pero poco frecuente tanto Tailandia como en Colombia, está asociada con el aumento de la susceptibilidad a la mefloquina, la lumefantrina y la dihidroartemisinina y por el contrario

disminuye la susceptibilidad a la cloroquina y la amodiaquina. Además, el haplotipo N86, Y184E en este gen reduce la efectividad de la piperquina en cepas africanas y asiáticas que además presentan una variante CVIET en el gen *pfcr1* asociado a la resistencia a la cloroquina. Esto hace pensar que el adecuado mapeo y monitoreo de las mutaciones en este gen facilitarían la aplicación selectiva de las diferentes terapias combinadas con derivados de la artemisinina de acuerdo con la distribución geográfica de estos haplotipos (Veiga MI, et al., 2016).

**Tabla 3-9:** Genotipos en el gen *pfmdr1* asociados a la resistencia/susceptibilidad a cloroquina, amodiaquina, lumefantrina y mefloquina identificados en Colombia.

Haplotipo	Frecuencia n (%)	Procedencia	Periodo de recolección	Referencia
$\alpha$ YYSND	1/15 (6,7)	Región Pacífica	1999-2001	Echeverry DF, et al., 2007
$\alpha$ NFSDD	6/15 (40)	Región Pacífica	1999-2001	Echeverry DF, et al., 2007
$\alpha$ NFSDY	8/15 (53,3)	Región Pacífica	1999-2001	Echeverry DF, et al., 2007
$\beta$ NFD	27/51 (52,9)	Región Pacífica (Guapi, Cauca)	2014-2017	Presente estudio
$\beta$ NY $\underline{Y}$	1/51 (2)	Región Pacífica (Guapi, Cauca)	2014-2017	Presente estudio
$\beta$ NFY	23/51 (45,1)	Región Pacífica (Guapi, Cauca)	2014-2017	Presente estudio

$\alpha$  = posiciones evaluadas 86, 184, 1034, 1042, 1246

$\beta$  = posiciones evaluadas 86, 184, 1246

### 3.4.7 Mutaciones en el grupo de genes PGB asociadas a la resistencia a la artemisinina

Las mutaciones no sinónimas en el gen *kelch13* de *P. falciparum* están asociadas con el retraso en la eliminación de la masa parasitaria en un individuo con infección malarica tratado con derivados con artemisinina (Ariey F, et al., 2014). Existe un perfil genético de mutaciones previas a la aparición de la mutación en el gen *kelch13*. Este perfil genético agrupa mutaciones en diversos genes y es conocido como PGB, por sus siglas del inglés “parasite genetic background” (Miotto O, et al., 2015). Las mutaciones no-sinónimas reconocidas como parte del antecedente genético parasitario son:

- V127M y D128Y/H en el gen *pfarps10*
- D193Y en el gen *ferredoxin*

- N326S y I356T en el gen *pfcr*
- T484I en el gen *pfmdr2*

A pesar de que el tratamiento con derivados de la artemisinina mantiene niveles altos de eficacia en muchos lugares del mundo, la tasa de reducción de la masa parasitaria posterior a las primeras dosis de tratamiento ha venido disminuyendo, lo cual se ha hecho evidente en el Sureste Asiático en los últimos 5 años, acompañado además de la identificación de cepas resistentes, con el riesgo de su diseminación desde Asia a África, semejante a lo ocurrido en el pasado con la resistencia a la cloroquina y la sulfadoxina-pirimetamina (Dondorp AM, et al., 2009; Amaratunga C, et al., 2012). El marcador molecular asociado con la resistencia de los derivados de la artemisinina está ubicado en el gen *kelch13* y existe también un antecedente genético relacionado con mutaciones en otros genes como se mencionó anteriormente. La asociación entre las mutaciones en el gen *kelch13* y este conjunto de mutaciones tiene distribuciones geográficas particulares y diferencias entre zonas de alta y baja transmisión para malaria. La identificación de este conjunto de mutaciones es considerada como riesgo para el desarrollo de resistencia en poblaciones de parásitos sensibles a la artemisinina y en ausencia de mutaciones en el gen *kelch13* (Miotto O, et al., 2015).

En el presente estudio se identificaron las mutaciones descritas previamente con las siguientes prevalencias:

- V127\* en el gen *pfarps10*, 2% (3/144); D128\* en el gen *pfarps10*, 17% (36/207) y D128H en el gen *pfarps10*, 0,5% (1/207);
- D193Y en el gen *ferredoxin*, 1% (2/205) y D193\* en el gen *ferredoxin*, 2% (4/205);
- N326S en el gen *pfcr*, 0,5% (1/204); N326\* en el gen *pfcr*, 5% (11/204); I356T en el gen *pfcr*, 1% (2/177) y I356\* en el gen *pfcr*, 1% (1/177);
- T484I en el gen *pfmdr2*, 0,5% (1/200) y T484\* en el gen *pfmdr2*, 1,5% (3/200);

(Nota: los asteriscos significan infecciones múltiples con posibles mutaciones).

Aunque en frecuencias bajas, estos resultados reflejan el potencial riesgo de desarrollo de resistencia a los derivados de artemisinina, a pesar de que los estudios de eficacia realizados en el país desde que el Ministerio de la Protección Social implementó su uso como esquema de primera línea para el tratamiento de la malaria no complicada por *P.*



*falciparum* en Colombia (Ministerio de la Protección Social, 2010) reporten respuesta clínica adecuada superior a 95% (Osorio L, et al., 2007.(a); Alvarez G, et al., 2010; Vásquez A, et al., 2009; Rojas-Alvarez DP, 2010; Aponte SL, et al., 2017; Montenegro M, et al., 2017).

Estudios previos en Colombia evaluaron las posiciones 326 y 356 del gen *pfcr*t encontrando mutaciones en las dos (N326S, N326D, I356T, I356L) como parte de los haplotipos CMNTHSQDTNLR (8,3%, 1/12) y CIETHSESTSTI (8,3%, 1/12) al evaluar las posiciones 72, 74-76, 97, 220, 271, 326, 333, 334, 356 y 371; este mismo estudio correlacionó estos hallazgos con la susceptibilidad a la cloroquina, la amodiaquina y la desetilamodiaquina y concluyó que la resistencia a estos medicamentos está asociada a diferentes polimorfismos en los genes *pfcr*t y *pfmdr*1 (Echeverry DF, et al., 2007).

Aunque en el presente estudio no se evaluó la presencia de mutaciones en el gen *kelch*13, estudios previos realizados en Colombia han informado la presencia del haplotipo silvestre en todos los casos (Pedreros MF, 2017; MalariaGEN, 2016; Aponte SL, et al., 2017; Montenegro M, et al., 2017).

Los haplotipos completos identificados para cada gen evaluado en general se distribuyeron de forma homogénea en todos los sitios de procedencia de las muestras, es decir en las zonas urbana y rural de Guapi, la zona rural de Timbiquí, la zona rural de Nariño e incluso en las muestras procedentes de la zona minera en Venezuela. Los mayores porcentajes se destacaron en las muestras procedentes de la zona rural de Guapi, lo cual podría explicarse por la mayor representatividad en el número de muestras evaluadas procedentes de este lugar; sin embargo, la identificación de mutaciones importantes como **CVIDT** en *pfcr*t y **VDDNI** en *pfmdr*2 podría estar relacionada con características ecológicas de transmisión (por ejemplo, patrón de movilidad humana) y de la estructura de población de *P. falciparum* que determinen la mayor probabilidad de aparición de mutaciones en el parásito.

### 3.4.8 Diversidad genética y estructura de población de *P. falciparum*

En el presente estudio se identificó una población estructurada del parásito con al menos tres subpoblaciones diferentes y baja diversidad de *P. falciparum* lo cual coincide con las características poblacionales de este parásito en zonas de baja transmisión (Corredor V, et al., 2010; Echeverry DF, et al., 2013; Mita T & Jombart T, 2015).

*P. falciparum* posee una importante capacidad de plasticidad pleomórfica y amplia diversidad genética al interior de las poblaciones, lo cual le permite una rápida adaptación a los cambios del medio ambiente, el desarrollo de resistencia a los medicamentos antimaláricos y evadir la respuesta inmune del hospedero a través de variación antigénica (Ferreira MU, et. al., 2004).

La diversidad genética se define como la ocurrencia de dos o más alelos de un locus específico a una frecuencia apreciable al interior de una misma población (Tanabe K, et. al., 2013). La frecuencia del alelo más común deberá ser inferior a 0,95 en poblaciones con menos de 100 individuos e inferior a 0,99 si son más de 100 individuos evaluados (Mita T & Jombart T, 2015). La caracterización de polimorfismos neutros en genes no relacionados con resistencia a los antimaláricos a través del uso de SNPs es una buena metodología para medir la diversidad genética (Mita T & Jombart T, 2015).

La diversidad genética de *P. falciparum* está determinada por su ancestro, los diferentes cuellos de botella a los que se enfrenta durante el ciclo biológico y los cuellos de botella que ha sufrido la población del parásito a lo largo de la historia durante la diseminación de esta especie desde África a América (Tanabe K, et. al., 2010). El  $F_{st}$  o coeficiente de diferenciación genética, permite describir la diferenciación genética entre subpoblaciones de *P. falciparum*. Se ha encontrado diferenciación importante entre poblaciones de Oceanía y América ( $F_{st}=0,42$ ), seguido de Asia vs América ( $F_{st}=0,33$ ) y África vs Asia ( $F_{st}=0,14$ ) (Anderson TJ, et al., 2000; Tanabe K, et. al., 2010).

Un estudio previo realizado en muestras procedentes de cuatro poblaciones de la Región Pacífica colombiana (Chocó, Valle, Cauca y Nariño), con el uso de 384 SNPs, identificó cuatro subpoblaciones bien diferenciadas ( $F_{st} = 0,084 - 0,279$ ), lo cual para los autores rechaza el supuesto de panmixia, es decir, que el proceso de entrecruzamiento de las población de parásitos en Colombia no es al azar (Echeverry DF, et al., 2013). Este

mismo trabajo encontró mayores diferencias entre las poblaciones de Cauca y Chocó ( $F_{st}=0,117$ ) que entre las poblaciones de Valle y Nariño ( $F_{st}=0,023$ ) (Echeverry DF, et al., 2013).

Con el empleo de un código de barras a partir de 24 SNPs, se identificó el origen de la especie de *P. falciparum* causante de una epidemia en Panamá entre 2001 y 2005 y se concluyó que estos parásitos se distribuyeron en tres subpoblaciones con estrecha relación con parásitos colombianos procedentes de Buenaventura y Tierralta y recolectados entre 2011 y 2012. Además, se concluyó que la epidemia era de origen clonal y expandida a partir de un caso importado (Obaldia N 3rd, et. al., 2015). Estos hallazgos soportan la aplicabilidad de estas metodologías moleculares para determinar la estructura de población del parásito y para definir el origen de una epidemia.

El análisis realizado en el presente estudio usando el programa Structure 2.3.4., identificó una población estructurada con al menos 3 subpoblaciones con diferentes ancestros genéticos puros o mezclados entre sí, similar a lo reportado por Echeverry D y colaboradores en parásitos de la Región Pacífica colombiana (Echeverry DF, et al., 2013). A pesar de que las muestras en el presente estudio proceden de un área geográfica limitada (aproximadamente 30 Km alrededor del casco urbano de Guapi), no hay una única población de parásitos, es decir, no hay una población única homogénea, lo cual implica que existe intercambio genético entre las subpoblaciones. El origen de las subpoblaciones podría ser producto de migraciones humanas o del mosquito, aunque esto último está limitado por accidentes geográficos como esteros o bocanas de los ríos, al igual que inundaciones producto de las mareas, lo cual impide desplazamientos lejanos del vector o que podría sobrepasar su capacidad máxima de vuelo, que llega hasta 7,2 km (Charlwood JD & Alecrim WA, 1989).

Los datos obtenidos en el dendrograma concuerdan con lo encontrado en el análisis realizado en Structure 2.3.4. Se observaron dos clones principales y un grupo de individuos posiblemente producto de eventos recombinatorios entre estos dos clones o genotipos nuevos que ingresan, posiblemente, a través de migraciones humanas. Como se describió, se diagnosticaron dos individuos procedentes de Venezuela, posiblemente del estado de Bolívar. El número máximo de diferencia con respecto a las muestras disponibles es 29 y el mínimo es de 13, con valores de “distancia p” de 0,3279 y 0,2419, respectivamente. De igual forma, el origen de esas infecciones procedentes de

Venezuela está soportado por el hecho de la presencia de los haplotipos de resistencia en *pfdhfr* y *pfdhps* característicos de la región oriental de la cordillera de los Andes en la Orinoquía y la Amazonía. Aunque estas dos muestras forman una sub-población diferente con una distancia amplia, el valor de la diferencia de la distancia no es mayor que las observadas en muestras procedentes de la región de estudio; por lo tanto, no es posible discriminar entre la variación debida a la recombinación entre las poblaciones clonales A y B (los dos clones principales) y la invasión de genotipos nuevos procedentes de poblaciones distantes, producto de la migración humana.

La distribución de los individuos en el dendrograma acompañado de la distribución geográfica de los casos hace sospechar que los dos principales clones se presentan en un territorio separado y que durante el aumento de casos de malaria o brotes epidémicos en regiones como el Carmelo, en zona rural de Guapi, se producen eventos recombinatorios entre los dos clones gracias a la movilidad humana propia de la región. Esto quiere decir que la infección endémica es predominantemente clonal y en las epidemias ocurren eventos recombinatorios entre los clones principales y que la transmisión endémica de las dos poblaciones principales se produce en toda el área de estudio, pero las epidemias ocurren en sitios específicos asociados, por ejemplo, con la extracción de oro. Las epidemias, al menos *in situ*, están constituidas por parásitos de los dos linajes y recombinantes que respaldan la hipótesis de que estos últimos son el resultado de la llegada de personas susceptibles y la creación de nuevos criaderos de mosquitos como resultado de las actividades mineras.

Con un porcentaje bajo, inferior al encontrado por Echeverry D y colaboradores, quienes reportaron 19% de infecciones múltiples (Echeverry DF, et al., 2013), el presente trabajo identificó 8,7% (estimado por el método "The Real McCOIL"), lo cual contrasta con los porcentajes altos de infecciones policlonales identificados en África, que pueden superar el 90% y que se asocian con niveles mayores de diversidad genética y entrecruzamiento de poblaciones de *P. falciparum*, muy probablemente relacionado con la mayor incidencia de la enfermedad en esta región (Neafsey DE, et. al., 2008).

La baja diversidad genética de las poblaciones de *P. falciparum* también ha sido demostrada en estudios previos con muestras colombianas. Un trabajo realizado en 1998 con muestra procedentes de la Región del Bajo Cauca utilizando marcadores microsatelitales identificó un índice de heterocigosis de 0,3 (desviación estándar +/- 0.08),

comparado con índices de 0,8 (DS+/-0,05), 0,8 (DS+/-0,04) y 0,8 (DS+/-0,02) de muestras procedentes de Uganda, Congo y Zimbabue en África (Anderson TJ, et. al., 2000). Un estudio realizado en 2001 en 390 muestras recolectadas en Quibdó y usando *msp1* y *msp2* como marcadores moleculares, identificó 40% de infección múltiple (Osorio L, et. al., 2007. (b)). Otro estudio que utilizó microsatélites neutros tanto para *P. vivax* como *P. falciparum* en muestras procedentes de la Región Pacífica y El Bajo Cauca-Alto Sinú, entre 2011 y 2013, encontró 47,7% de infección múltiple para *P. vivax* y 14,8% para *P. falciparum* (Pacheco MA, et. al., 2016). En un trabajo reciente realizado en 133 muestras recolectadas en Guapi entre 2014 y 2015, utilizando seis marcadores microsatelitales se identificaron índices de heterocigosis bajos entre 0,028 y 0,578 (Pedreros MF, 2017). Todo lo anterior indica que las infecciones múltiples por *P. falciparum* en Colombia históricamente son bajas y que los resultados son consistentes, a pesar de usar diferentes metodologías para su identificación.

Los cambios en la prevalencia e incidencia en la enfermedad asociados a las intervenciones para el control de la malaria en Colombia y en la Región Pacífica en particular podría haber afectado la estructura de la población de *P. falciparum* en los últimos años. Las estrategias recientes utilizadas durante el desarrollo del Proyecto Malaria Colombia entre 2010 y 2015 impactaron en la casuística de malaria, generando una reducción de casos en este periodo, pero con un claro aumento de casos al terminar dichas actividades, lo cual se evidencia en el importante aumento de casos en Colombia y la Región Pacífica durante 2016 (INS, 2016) y es posible que esto haya generado la reemergencia de parásitos con diferente estructura poblacional. Más allá de los objetivos del presente estudio, queda pendiente por dilucidar el impacto de las estrategias de control en la estructura de la población del parásito.

De igual forma, sería interesante determinar las diferencias geográficas por ecosistemas y que involucre la caracterización del vector entre las diferentes subpoblaciones del parásito, además de determinar las características clínicas de la infección, las características de los portadores asintomáticos y las características fenotípicas del parásito como la respuesta a los antimaláricos, la capacidad de invasión al eritrocito, la capacidad de producción de gametocitos o la adaptabilidad del parásito al vector. Este tipo de estudios permitiría saber si existe algún determinante biológico o en la estructura de población del parásito que defina, por ejemplo, el predominio de un clon o una

población específica del mismo en los individuos sintomáticos o asintomáticos, en la zona urbana o rural, en una especie del vector, entre otros aspectos.

Una limitación del presente estudio fue la ausencia de datos correspondientes a los genotipos de los parásitos causantes de la malaria asintomática, debido a la escasez de la muestra y a la presencia de bajas parasitemias en la mayoría de ellos.

## Referencias

Alvarez G, Tobón A, Piñeros J, Ríos A, Blair S: Dynamics of *Plasmodium falciparum* Parasitemia Regarding Combined Treatment Regimens for Acute Uncomplicated Malaria, Antioquia, Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;83(1):90–96.

Amaratunga C, Sreng S, Suon S, Phelps ES, Stepniewska K, Lim P, Zhou C, Mao S, Anderson JM, Lindegardh N, Jiang H, Song J, Su XZ, White NJ, Dondorp AM, Anderson TJ, Fay MP, Mu J, Duong S, Fairhurst RM. Artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Pursat province, western Cambodia: a parasite clearance rate study. *Lancet Infect Dis.* 2012 Nov;12(11):851-8. doi: 10.1016/S1473-3099(12)70181-0. Epub 2012 Aug 30.

Amato R, Lim P, Miotto O, Amaratunga C, Dek D, Pearson RD, et al. Genetic markers associated with dihydroartemisinin-piperazine failure in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: a genotype-phenotype association study. *Lancet Infect Dis.* 2017 Feb;17(2):164-173. doi: 10.1016/S1473-3099(16)30409-1. Epub 2016 Nov 3.

Anderson T, Nkhoma S, Ecker A, Fidock D. How can we identify parasite genes that underlie antimalarial drug resistance?. *Pharmacogenomics.* 2011 Jan;12(1):59-85. doi: 10.2217/pgs.10.165.

Anderson TJ, Haubold B, Williams JT, Estrada-Franco JG, Richardson L, Mollinedo R, Bockarie M, Mokili J, Mharakurwa S, French N, Whitworth J, Velez ID, Brockman AH, Nosten F, Ferreira MU, Day KP. Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol.* 2000 Oct;17(10):1467-82.

Aponte S, Guerra ÁP, Álvarez-Larrotta C, Bernal SD, Restrepo C, González C, Yasnot MF, Knudson-Ospina A. Baseline in vivo, ex vivo and molecular responses of *Plasmodium falciparum* to artemether and lumefantrine in three endemic zones for malaria in Colombia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2017 Feb 1;111(2):71-80. doi: 10.1093/trstmh/trx021.

Aponte SL, Díaz G, Pava Z, Echeverry DF, Iburguen D, Rios M, Murcia LM, Quelal C, Murillo C, Gil P, Björkman A, Osorio L. Sentinel network for monitoring *in vitro* susceptibility of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs in Colombia: a proof of concept. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011 Aug;106 Suppl 1:123-9.

Ariey F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois AC, Khim N, et al. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2014;505.

Awasthi G, Das A. Genetics of chloroquine-resistant malaria: a haplotypic view. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013 Dec;108(8):947-61. doi: 10.1590/0074-0276130274.

Awasthi G, Prasad GB, Das A: Population genetic analyses of *Plasmodium falciparum* chloroquine receptor transporter gene haplotypes reveal the evolutionary history of chloroquine-resistant malaria in India. *Int J Parasitol*. 2011;41:705-709.

Bacon DJ, AM McCollum, SM Griffing, C Salas, V Soberon, M Santolalla, R Haley, P Tsukayama, C Lucas, AA Escalante and V Udhayakumar. "Dynamics of malaria drug resistance patterns in the Amazon basin region following changes in Peruvian national treatment policy for uncomplicated malaria." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009;53(5):2042-2051.

Best Plummer W, Pinto Pereira LM, Carrington CV. *Pfprt* and *pfmdr1* alleles associated with chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* from Guyana, South America. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99:389-392.

Carrasquilla G, Barón C, Monsell EM, Cousin M, Walter V, Lefèvre G, Sander O, Fisher LM. Randomized, prospective, three-arm study to confirm the auditory safety and efficacy of artemether-lumefantrine in Colombian patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 2012 Jan;86(1):75-83. doi: 10.4269/ajtmh.2012.11-0192.

Chang HH, Worby CJ, Yeka A, Nankabirwa J, Kanya MR, Staedke SG, Dorsey G, Murphy M, Neafsey DE, Jeffreys AE, Hubbart C, Rockett KA, Amato R, Kwiatkowski DP, Buckee CO, Greenhouse B. THE REAL McCOIL: A method for the concurrent estimation of the complexity of infection and SNP allele frequency for malaria parasites. *PLoS Comput Biol*. 2017 Jan 26;13(1):e1005348. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005348. eCollection 2017 Jan.

Chaparro J, Rojas M, Rubiano C, Wasserman M. Frecuencia de mutaciones asociadas con resistencia a pirimetamina y sulfadoxina. Análisis de muestras clínicas procedentes de un área endémica para *Plasmodium falciparum*. *Iatreia*. 2000;13(2):88.

Charlwood JD, Alecrim WA. Capture-recapture studies with the South American malaria vector *Anopheles darlingi*, Root. *Ann Trop Med Parasitol*. 1989 Dec;83(6):569-76.

Chen N, Kyle DE, Pasay C, Fowler EV, Baker J, Peters JM, Cheng Q. *pfprt* Allelic types with two novel amino acid mutations in chloroquineresistant *Plasmodium falciparum* isolates from the Philippines. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:3500-3505.

Corredor V, Murillo C, Echeverry DF, Benavides J, Pearce RJ, Roper C, Guerra AP, Osorio L. Origin and dissemination across the Colombian Andes mountain range of

sulfadoxine-pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Aug;54(8):3121-5. doi: 10.1128/AAC.00036-10. Epub 2010 May 24.

Davis TM, Hung TY, Sim IK, Karunajeewa HA, Ilett KF. Piperaquine: a resurgent antimalarial drug. *Drugs*. 2005;65(1):75-87.

Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, Lwin KM, Ariey F, Hanpithakpong W, Lee SJ, Ringwald P, Silamut K, Imwong M, Chotivanich K, Lim P, Herdman T, An SS, Yeung S, Singhasivanon P, Day NP, Lindegardh N, Socheat D, White NJ. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med*. 2009 Jul 30;361(5):455-67. doi: 10.1056/NEJMoa0808859. Erratum in: *N Engl J Med*. 2009 Oct 22;361(17):1714.

Echeverry DF, Holmgren G, Murillo C, Higueta JC, Björkman A, Gil JP, Osorio L. Short report: polymorphisms in the *pfprt* and *pfmdr1* genes of *Plasmodium falciparum* and *in vitro* susceptibility to amodiaquine and desethylamodiaquine. *Am J Trop Med Hyg*. 2007 Dec;77(6):1034-8.

Echeverry DF, Nair S, Osorio L, Menon S, Murillo C, Anderson TJ. Long term persistence of clonal malaria parasite *Plasmodium falciparum* lineages in the Colombian Pacific region. *BMC Genet*. 2013 Jan 7;14:2. doi: 10.1186/1471-2156-14-2.

Falush D, Stephens M, Pritchard JK. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Mol Ecol Notes*. 2007 Jul 1;7(4):574-578.

Ferreira MU, da Silva Nunes M, Wunderlich G. Antigenic diversity and immune evasion by malaria parasites. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004;11:987-95.

Fierro BH. Genotipos de *Plasmodium falciparum* asociados a la resistencia a sulfadoxina/pirimetamina en Colombia. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. 2017.

Frosch AE, Laufer MK, Mathanga DP, Takala-Harrison S, Skarbinski J, Claassen CW, Dzinjalama FK, Plowe CV. Return of widespread chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* to Malawi. *J Infect Dis*. 2014 Oct 1;210(7):1110-4. doi: 10.1093/infdis/jiu216. Epub 2014 Apr 9.

Gabryszewski SJ, Modchang C, Musset L, Chookajorn T, Fidock DA. Combinatorial Genetic Modeling of *pfprt*-Mediated Drug Resistance Evolution in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol*. 2016 Jun;33(6):1554-70. doi: 10.1093/molbev/msw037. Epub 2016 Feb 22.

Galindo JA, Cristiano FA, Knudson A, Nicholls RS, Guerra AP. Point mutations in dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genes of *Plasmodium falciparum* from three endemic malaria regions in Colombia. *Biomedica*. 2010 Jan-Mar;30(1):56-64.



Galinsky K, Valim C, Salmier A, de Thoisy B, Musset L, Legrand E, et al. COIL: a methodology for evaluating malarial complexity of infection using likelihood from single nucleotide polymorphism data. *Malar J*. 2015;14:4.

Giraldo LE, Acosta MC, Labrada LA, Praba A, Montenegro-James S, Saravia NG, Krogstad DJ. Frequency of the Asn-108 and Thr-108 point mutations in the dihydrofolate reductase gene in *Plasmodium falciparum* from southwest Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 1998 Jul;59(1):124-8.

González IJ, Varela RE, Murillo C, Ferro BE, Salas J, Giraldo LE, Zalis MG, Saravia NG. Polymorphisms in *cg2* and *pfcr1* genes and resistance to chloroquine and other antimalarials *in vitro* in *Plasmodium falciparum* isolates from Colombia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2003 May-Jun;97(3):318-24.

Gregson A, Plowe CV. Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates. *Pharmacological reviews*. 2005;57(1):117-45.

Griffing SM, L Syphard, S Sridaran, AM McCollum, T Mixson-Hayden, S Vinayak, L Villegas, JW Barnwell, AA Escalante, V Udhayakumar. “*pfmdr1* amplification and fixation of *pfcr1* chloroquine resistance alleles in *Plasmodium falciparum* in Venezuela.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010;54(4):1572-1579.

Haldar K, Bhattacharjee S, Safeukui I. Drug resistance in *Plasmodium*. *Nat Rev Microbiol*. 2018 Mar;16(3):156-170. doi: 10.1038/nrmicro.2017.161. Epub 2018 Jan 22. Review.

Harinasuta T, Suntharasamai P, Viravan C: Chloroquine-resistant *falciparum* malaria in Thailand. *Lancet*. 1965;2:657-660.

Hatabu T, Iwagami M, Kawazu S, Taguchi N, Escueta AD, Villacorte EA, Rivera PT, Kano S: Association of molecular markers in *Plasmodium falciparum* *cr1* and *mdr1* with *in vitro* chloroquine resistance: a Philippine study. *Parasitol Int*. 2009;58:166-170.

Hernández DC, Guerra AP, Cucunubá ZM, Nicholls RS, Barrera SM. Haplotypes associated with resistance to sulfadoxine-pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* in two malaria endemic locations in Colombia. *Infect Genet Evol*. 2013 Aug;18:183-90. doi: 10.1016/j.meegid.2013.05.017. Epub 2013 May 25.

Huaman MC, Yoshinaga K, Suryanatha A, Suarsana N, Kanbara H: Polymorphisms in the chloroquine resistance transporter gene in *Plasmodium falciparum* isolates from Lombok, Indonesia. *Am J Trop Med Hyg*. 2004;71:40-42.

Hyde JE, Dittrich S, Wang P, Sims PF, de Crecy-Lagard V, Hanson AD. *Plasmodium falciparum*: a paradigm for alternative folate biosynthesis in diverse microorganisms? *Trends Parasitol*. 2008;24:502–508.

Instituto Nacional de Salud (INS)–Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública. Boletín epidemiológico semanal. Número 52 de 2016.

Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0.

Lim P, Chy S, Arieu F, Incardona S, Chim P, Sem R, Denis MB, Hewitt S, Hoyer S, Socheat D, Mercereau-Puijalon O, Fandeur T: *pfcr* polymorphism and chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* strains isolated in Cambodia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:87-94.

MalariaGEN *Plasmodium falciparum* Community Project. Genomic epidemiology of artemisinin resistant malaria. *Elife.* 2016 Mar 4;5. pii: e08714. doi: 10.7554/eLife.08714.

Malmberg M, Ferreira PE, Tarning J, Ursing J, Ngasala B, Bjorkman A, et al. *Plasmodium falciparum* drug resistance phenotype as assessed by patient antimalarial drug levels and its association with *pfmdr1* polymorphisms. *The Journal of Infectious Diseases.* 2013;207(5):842-7.

Méndez F, Muñoz A, Carrasquilla G, Jurado D, Arévalo-Herrera M, Cortese JF, Plowe CV. Determinants of treatment response to sulfadoxine-pyrimethamine and subsequent transmission potential in falciparum malaria. *Am J Epidemiol.* 2002 Aug 1;156(3):230-8.

Ministerio de la Protección Social. Guía para atención clínica integral del paciente con malaria. 2010. Disponible en: [https://www.paho.org/col/index.php?option=com\\_docman&view=download&category\\_slug=publicaciones-ops-oms-colombia&alias=1220-guia-para-la-atencion-clinica-integral-del-paciente-con-malaria&Itemid=688](https://www.paho.org/col/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=publicaciones-ops-oms-colombia&alias=1220-guia-para-la-atencion-clinica-integral-del-paciente-con-malaria&Itemid=688).

Ministerio de Salud. Consejo Nacional de Seguridad Social en Salud. Acuerdo 117 de 1998. Resolución 412 de 2000. Normas técnicas y guías de atención para el manejo de las enfermedades de interés en Salud Pública.2000.

Miotto O, Amato R, Ashley EA, MacInnis B, Almagro-Garcia J, Amaratunga C, et al. Genetic architecture of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum*. *Nature Genetics.* 2015; 47(3): 226-34. doi: 10.1038/ng.3189.

Mita T, Jombart T. Patterns and dynamics of genetic diversity in *Plasmodium falciparum*: what past human migrations tell us about malaria. *Parasitol Int.* 2015 Jun;64(3):238-43. doi: 10.1016/j.parint.2014.09.007. Epub 2014 Oct 8.

Mita T, Tanabe K, Kita K. Spread and evolution of *Plasmodium falciparum* drug resistance. *Parasitol Int.* 2009 Sep;58(3):201-9. doi: 10.1016/j.parint.2009.04.004. Epub 2009 Apr 23. Review.

Montenegro M, Neal AT, Posada M, De Las Salas B, Lopera-Mesa TM, Fairhurst RM, Tobon-Castaño A. K13 Propeller Alleles, *mdr1* Polymorphism, and Drug Effectiveness at Day 3 after Artemether-Lumefantrine Treatment for *Plasmodium falciparum* Malaria

in Colombia, 2014-2015. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017 Nov 22;61(12). pii: e01036-17. doi: 10.1128/AAC.01036-17. Print 2017 Dec.

Montoya P, Tobón A, Blair S, Carmona J, Maestre A. [Polymorphisms of the *pfmdr1* gene in field samples of *Plasmodium falciparum* and their association with therapeutic response to antimalarial drugs and severe malaria in Colombia]. *Biomedica.* 2007 Jun;27(2):204-15. Epub 2007 Aug 21.

Moore DV, Lanier JE: Observations on two *Plasmodium falciparum* infections with an abnormal response to chloroquine. *Am J Trop Med Hyg.* 1961;10:5-9.

Nagesha HS, Casey GJ, Rieckmann KH, Fryauff DJ, Laksana BS, Reeder JC, Maguire JD, Baird JK: New haplotypes of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (*pfcr1*) gene among chloroquineresistant parasite isolates. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;68:398-402.

Neafsey DE, Schaffner SF, Volkman SK, Park D, Montgomery P, Milner DA Jr, Lukens A, Rosen D, Daniels R, Houde N, Cortese JF, Tyndall E, Gates C, Stange-Thomann N, Sarr O, Ndiaye D, Ndir O, Mboup S, Ferreira MU, Moraes Sdo L, Dash AP, Chitnis CE, Wiegand RC, Hartl DL, Birren BW, Lander ES, Sabeti PC, Wirth DF. Genome-wide SNP genotyping highlights the role of natural selection in *Plasmodium falciparum* population divergence. *Genome Biol.* 2008;9(12):R171. doi: 10.1186/gb-2008-9-12-r171. Epub 2008 Dec 15.

Obaldia N 3rd, Baro NK, Calzada JE, Santamaria AM, Daniels R, Wong W, et al. Clonal outbreak of *Plasmodium falciparum* infection in eastern Panama. *J Infect Dis.* 2015 Apr 1;211(7):1087-96. doi: 10.1093/infdis/jiu575. Epub 2014 Oct 21.

Organización Panamericana de la Salud (OPS). Vigilancia molecular de la resistencia de *Plasmodium falciparum* a los antimaláricos (de 2005 a 2012). 2012. Disponible en: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2013/Molecula-Surv-Plasmodium-2005-2012-Spa.pdf>.

Osorio L, Gonzalez I, Olliaro P, Taylor W: Artemisinin-based combination therapy for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Colombia. *Malar J.* 2007;6:25.(a).

Osorio L, Todd J, Pearce R, Bradley DJ. The role of imported cases in the epidemiology of urban *Plasmodium falciparum* malaria in Quibdó, Colombia. *Trop Med Int Health.* 2007 Mar;12(3):331-41.(b).

Oyola SO, Ariani CV, Hamilton WL, Kekre M, Amenga-Etego LN, Ghansah A, et al. Whole genome sequencing of *Plasmodium falciparum* from dried blood spots using selective whole genome amplification. *Malar J.* 2016 Dec 20;15(1):597. doi: 10.1186/s12936-016-1641-7.

Pacheco MA, Lopez-Perez M, Vallejo AF, Herrera S, Arévalo-Herrera M2, Escalante AA. Multiplicity of Infection and Disease Severity in *Plasmodium vivax*. *PLoS Negl*

Trop Dis. 2016 Jan 11;10(1):e0004355. doi: 10.1371/journal.pntd.0004355. eCollection 2016 Jan.

Payne D. Spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. Parasitol Today.1987;3:241–246.

Pedrerros MF. Determinación de genotipos circulantes de loci asociados a la resistencia a drogas antimaláricas en *Plasmodium falciparum* en la población de Guapi, Departamento del Cauca, Colombia. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. 2017.

Picot S, Olliaro P, de Monbrison F, Bienvenu AL, Price RN, Ringwald P. A systematic review and meta-analysis of evidence for correlation between molecular markers of parasite resistance and treatment outcome in falciparum malaria. Malaria journal. 2009;8:89.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics. 2000 Jun;155(2):945-59.

Randrianarivelojosia M, Fidock DA, Belmonte O, Valderramos SG, Mercereau-Pujalon O, Ariey F: First evidence of *pfcr*t mutant *Plasmodium falciparum* in Madagascar. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2006;100:826-830.

Restrepo E, Carmona-Fonseca J, Maestre A. *Plasmodium falciparum*: high frequency of *pfcr*t point mutations and emergence of new mutant haplotypes in Colombia. Biomedica. 2008 Dec;28(4):523-30.

Rojas-Alvarez DP. Evaluacion de la eficacia terapeutica y la tolerabilidad de las combinaciones fijas de Artesunato/Amodiaquina y Artemeter/Lumefantrina para el tratamiento de la malaria por *Plasmodium falciparum* no complicada en el departamento del Choco (Colombia). Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. 2010.

Sá JM, Twu O, Hayton K, Reyes S, Fay MP, Ringwald P, Wellems TE. Geographic patterns of *Plasmodium falciparum* drug resistance distinguished by differential responses to amodiaquine and chloroquine. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Nov 10;106(45):18883-9. doi: 10.1073/pnas.0911317106. Epub 2009 Nov 2.

Schmider N, Peyerl-Hoffmann G, Restrepo M, Jelinek T. Short communication: point mutations in the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genes of *Plasmodium falciparum* isolates from Colombia. Trop Med Int Health. 2003 Feb;8(2):129-32.

Sneath PHA and Sokal RR. Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco. 1973.

Spot Malaria. Genetic Report Card User Guide. 2017. Disponible en: <https://www.malariagen.net/projects/spotmalaria>.

Takahashi N, Tanabe K, Tsukahara T, Dzodzomenyo M, Dysoley L, Khamlome B, Sattabongkot J, Nakamura M, Sakurai M, Kobayashi J, Kaneko A, Endo H, Hombhanje F, Tsuboi T, Mita T. Large-scale survey for novel genotypes of *Plasmodium falciparum* chloroquine-resistance gene *pfcr*. Malar J. 2012 Mar 28;11:92. doi: 10.1186/1475-2875-11-92.

Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 2004;101:11030-11035.

Tanabe K, Mita T, Jombart T, Eriksson A, Horibe S, Palacpac N, et al. *Plasmodium falciparum* accompanied the human expansion out of Africa. Curr Biol. 2010;20:1283–9.

Tanabe K, Mita T, Palacpac NM, Arisue N, Tougan T, Kawai S, et al. Within-population genetic diversity of *Plasmodium falciparum* vaccine candidate antigens reveals geographic distance from a Central sub-Saharan African origin. Vaccine 2013;31:1334–9.

Valderramos SG, Valderramos JC, Musset L, Purcell LA, Mercereau-Puijalon O, Legrand E, Fidock DA. Identification of a mutant *Pfcr*-mediated chloroquine tolerance phenotype in *Plasmodium falciparum*. PLoS Pathog. 2010 May 13;6(5):e1000887. doi: 10.1371/journal.ppat.1000887.

Vásquez A, Sanín F, Alvarez L, Tobón A, Ríos A, Blair S: Therapeutic efficacy of a regimen of artesunate-mefloquine-primaquine treatment for *Plasmodium falciparum* malaria and treatment effects on gametocytic development. Biomedica. 2009;29(2):307–319.

Veiga MI, Dhingra SK, Henrich PP, Straimer J, Gnädig N, Uhlemann AC, Martin RE, Lehane AM, Fidock DA. Globally prevalent *Pfmdr1* mutations modulate *Plasmodium falciparum* susceptibility to artemisinin-based combination therapies. Nat Commun. 2016 May 18;7:11553. doi: 10.1038/ncomms11553.

Veiga MI, Dhingra SK, Henrich PP, Straimer J, Gnädig N, Uhlemann AC, Martin RE, Lehane AM, Fidock DA. Globally prevalent *Pfmdr1* mutations modulate *Plasmodium falciparum* susceptibility to artemisinin-based combination therapies. Nat Commun. 2016 May 18;7:11553. doi: 10.1038/ncomms11553.

Viana GM, Machado RL, Calvosa VS, Póvoa MM. Mutations in the *pfmdr1*, *cg2*, and *pfcr* genes in *Plasmodium falciparum* samples from endemic malaria areas in Rondonia and Pará State, Brazilian Amazon Region. Cad Saude Publica. 2006 Dec;22(12):2703-11.

Vieira PP, Ferreira MU, Alecrim Md, Alecrim WD, da Silva LH, Sihuincha MM, Joy DA, Mu J, Su XZ, Zalis MG. *pfcr* Polymorphism and the spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* populations across the Amazon Basin. *J Infect Dis.* 2004 Jul 15;190(2):417-24. Epub 2004 Jun 18.

Vinayak S, Alam MT, Mixson-Hayden T, McCollum AM, Sem R, Shah NK, Lim P, Muth S, Rogers WO, Fandeur T, Barnwell JW, Escalante AA, Wongsrichanalai C, Ariey F, Meshnick SR, Udhayakumar V. Origin and evolution of sulfadoxine resistant *Plasmodium falciparum*. *PLoS Pathog.* 2010 Mar 26;6(3):e1000830. doi: 10.1371/journal.ppat.1000830.

WAARN. Molecular Module. 2011. Leukocyte depletion of hole blood using CF11 columns v1.2. WAARN procedure.

Wootton JC, Feng X, Ferdig MT, Cooper RA, Mu J, Baruch DI, Magill AJ, Su XZ: Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in *Plasmodium falciparum*. *Nature* 2002, 418:320-323.

Wootton JC, Feng X, Ferdig MT, Cooper RA, Mu J, Baruch DI, Magill AJ, Su XZ: Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 2002;418:320-323.

World Health Organization (WHO). Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010. 2011. Disponible en: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44449/9789241500470\\_eng.pdf?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44449/9789241500470_eng.pdf?sequence=1).

World Health Organization (WHO). Guidelines for the treatment of malaria, 3rd ed, WHO, Ginebra, 2015. Disponible en: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241549127/en/>.

## **4. Objetivo específico 3**

### **4.1 Objetivo específico 3**

Identificar grupos de riesgo para infección por malaria en el barrio Santa Mónica, Guapi-Cauca y en la vereda El Cuerval, Timbiquí-Cauca, Colombia.

### **4.2 Metodología**

#### **4.2.1 Tipo de estudio**

Estudio experimental descriptivo. Se tomaron muestras de suero de individuos asintomáticos durante cuatro mediciones realizadas en los años 2015 (marzo-abril y septiembre-octubre) y 2016 (marzo-abril y septiembre-octubre) en el barrio Santa Mónica de Guapi y dos mediciones más en diciembre de 2015 y mayo de 2017 en El Cuerval, Timbiquí. Las muestras de sueros obtenidas de los individuos asintomáticos fueron evaluadas contra micromatrices (microarrays) de proteínas especialmente diseñadas e impresas a partir de antígenos del parásito. Se seleccionó un grupo de antígenos presentes en *P. falciparum* y *P. vivax*, caracterizado por un alto nivel de expresión antigénica y que había sido evaluado utilizado para establecer marcadores serológicos en otros estudios (Zenonos ZA, et al., 2014; Crosnier C, et al., 2013; Osier FH, et al., 2014; França CT, et al., 2016; Hostetler JB, et al., 2015). Posteriormente se utilizó un modelo multivariable con regresión logística, cuya variable dependiente binomial fue seropositividad y las variables independientes correspondieron a características demográficas, antecedentes y pruebas de laboratorio con el fin de identificar grupos de riesgo para infección malárica (Kleinbaum DG & Klein M, 2010).

## 4.2.2 Selección de antígenos

Se utilizaron 116 antígenos de *P. falciparum* y 12 de *P. vivax*. Estos antígenos fueron seleccionados de acuerdo con su capacidad inmunogénica, la cual fue evaluada previamente en el Departamento de Inmunología e Infecciones del London School of Hygiene and Tropical Medicine y en el Programa de Malaria del Wellcome Sanger Institute, en Cambridge, Reino Unido (King CL, et al., 2015; Helb DA, et al., 2015). De estos antígenos, 18 fueron producidos a partir de genes clonados en plásmidos que incluían genes de *P. falciparum* y *P. vivax* con un fragmento C-terminal marcado con CD4 e histidina (Tabla 4-1). Estos 18 antígenos fueron producidos en las instalaciones del Programa de Malaria en el Wellcome Sanger Institute, en Cambridge, Reino Unido a partir de los plásmidos correspondientes disponibles en este laboratorio ([https://www.addgene.org/Julian\\_Rayner/](https://www.addgene.org/Julian_Rayner/)) y como se explica en el apartado siguiente.

**Tabla 4-1:** Listado de los 18 antígenos de *P. falciparum* y *P. vivax* seleccionados para su expresión.

Antígenos de <i>Plasmodium falciparum</i>	Antígenos de <i>Plasmodium vivax</i>
MSP11	Pv.GAMMA
AMA1	Pv.P12
Pf113	Pv.MSP5
MSRP1	Pv.DBP
MSP1	Pv.ARP2
MSP3	Pv.CyRPA
Pf3D7 0606800	Pv.MSP3a
P41	Pv.MSP10
Pf3D7 1136200	Pv.081550

## 4.2.3 Producción de los 18 antígenos en el Wellcome Sanger Institute. Sistema de expresión celular en eucariotas

### ▪ Transformación de bacterias competentes

Cada uno de los 18 plásmidos de *P. falciparum* y *P. vivax* previamente construidos fueron transformados en bacterias competentes *Escherichia coli* JM109 (10977961-Promega). Para la transformación se utilizaron 50 µl de bacterias *E. coli* JM109 descongeladas a



4°C sobre hielo, por cada 1 - 2 µl de plásmido. La mezcla se incubó en hielo por 30 minutos y los plásmidos fueron integrados en las bacterias mediante choque térmico a 42°C por 45 segundos e incubación inmediata en hielo. Se agregaron 250 µl de medio SOC (Thermo Fisher Scientific 15544034) y las bacterias se incubaron a 37°C durante una hora. El volumen total del cultivo se sembró en placas de agar con ampicilina (100µg/ml) y se incubó a 37°C durante toda la noche. Se seleccionaron colonias individuales y se colocaron en medio LB con 2 ml de ampicilina a 100 µg/ml durante el día y se expandieron a 100 ml de medio durante la noche, incubadas a 37°C en agitación. El ADN plasmídico fue extraído con un kit MIDI-prep [Plasmid DNA purification (NucleoBond® Xtra Midi / Maxi)] siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo C). La identidad correcta del plásmido fue verificada mediante secuenciamiento en GATC Biotech-Germany.

#### ▪ **Transfección de los plásmidos en el sistema celular HEK-293E**

Se utilizó la línea HEK-293E de células embrionarias de riñón humano para expresar los 18 antígenos de *P. falciparum* y *P. vivax* seleccionados (Tabla 4-1). La línea celular HEK-293E se utiliza con mucha frecuencia, pues es fácil de cultivar y transfectar. El mantenimiento del cultivo celular se realizó en medio Freestyle 293 (12338026 Life Technologies) suplementado con 1% de suero fetal bovino (F2442. Lote 128K8423 SIGMA) y 0,1% de disulfato de geneticina (G418) como antibiótico selectivo (10131027 Life Sciences). Las células fueron mantenidas en frascos Erlenmeyer de 50 ml bajo condiciones estándar de cultivo (37°C, humedad relativa de 70% y concentración de CO<sub>2</sub> de 5%) y agitación constante a 125 rpm (Tom R, et al., 2008).

Para la transfección se utilizaron suspensiones de 2,5x10<sup>5</sup> células/ml. Por cada 50 ml de cultivo celular se utilizaron 2 ml de medio Freestyle 293 sin suplemento (12338026 Life Technologies), 25 µg de plásmido de *P. falciparum* o de *P. vivax* (1 mg/ml) y 50 µl en una concentración de 1 mg/ml de polietilenamida (PEI). La mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente se depositó en un frasco Erlenmeyer con 50 ml del cultivo celular a ser transfectado. Se utilizaron entre 3 y 5 frascos Erlenmeyer por plásmido que fueron mantenidos bajo las condiciones estándar de cultivo y agitación a 125 rpm durante 6 días.

### ▪ Cromatografía de afinidad

Para la purificación de los antígenos se utilizó el método de inmovilización por afinidad con metales, basado en la interacción de estos con el aminoácido histidina. El extremo C-terminal de las 18 proteínas contenía una secuencia de polihistidinas con una alta afinidad por níquel, lo que permitió aislar los antígenos a partir del sobrenadante del medio de cultivo cuando se filtró a través de columnas diseñadas para retener las esferas. Las células HEK-293E fueron separadas por centrifugación y el medio de cultivo clarificado se incubó con la resina de níquel, como se describe en detalle en el Anexo D. Los antígenos se eluyeron en una solución amortiguadora a pH ajustado a 7,4 con imidazol (Anexo D) (Bornhorst JA & Falke JJ, 2000). Posteriormente se confirmó la presencia de las proteínas mediante corrido electroforético en gel de poliacrilamida (NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Protein Gels, 1,0 mm, 12-well- Invitrogen™) (Anexo E). La concentración de proteína se evaluó por la técnica de Bradford (Quick Start™ Bradford Protein Assay Gel de proteínas- BIO RAD) (Anexo F).

A lo largo del texto, los 18 antígenos que fueron expresados en sistema celular en eucariotas en el Wellcome Sanger Institute se identifican con una letra “s” entre paréntesis (s) y se especifica también su respectiva dilución, utilizando fracciones.

#### **4.2.4 Antígenos producidos en el London School of Hygiene and Tropical Medicine. Sistema de expresión celular en procariontes**

Los 98 antígenos restantes correspondieron a péptidos y epítopes antigénicos sintéticos previamente diseñados y producidos en sistemas de expresión celular en *Escherichia coli*. Estos correspondieron a antígenos de superficie del merozoíto, antígenos relacionados o no con proteínas de superficie del merozoíto y otros grupos de familias como proteínas hipotéticas, surfinas, entre otros (Helb DA, et al., 2015). Dicho material se encontraba disponible en el laboratorio del departamento de inmunología e infecciones del London School of Hygiene and Tropical Medicine, Reino Unido y se presenta en la Tabla 4-2.

**Tabla 4-2:** Listado de los antígenos de *P. falciparum* procedentes del London School of Hygiene and Tropical Medicine.

Antígenos de Superficie			
MSP1 block 2 Well full	MSP2 [5-60B]	MSP DBL2 T9/96	MSP3-3D7
MSP1 bk2 Well Rep	MSP2 [15-30B]	MSP DBL1 Fcc2	MSP3-K1
MSP1 block 2 Palo Alto Repeat	MSP2 [62-22A]	MSPDBL2 C-term	MSP 4
MSP1 block 2 Palo Alto full #6	MSP2 [17-26B]	MSPDBL1 C-term	MSP 5
MSP1 block 2 MAD20 flank	MSP2 [15-38B]	MSP DBL1 N-term	MSP6 A(1)
MSP1 bk2 Hybrid A	MSP2 [62-18R]	MSPDBL2 N-term	MSP6 B
MSP1 bk2 Hybrid B	MSP2 [62-22B]	MSP DBL2 T9/96	MSP7
MSP1 bk2 Hybrid C	MSP2 [120-14D]		
MSP1 bk2 Hybrid D	MSP2 [15-34B]	PfAMA1	
MSP1 bk2 Hybrid E	MSP2 CH150/9		
MSP1 bk2 Hybrid F	MSP2 [47-30A]	MSRP 5B	
MSP1 bk 2 K1 flank	MSP2 [5-26C]	MSRP2B	
MSP1 bk2 MAD20 Rep	MSP2 [52-42A]		
MSP1 bk2 MAD20 full	MSP2 [15-42C]		
MSP1 bk2 3D7 Rep	MSP2 [17-34A]		
MSP1 block 2 R033	MSP2 [5-36A]		
MSP1 bk 2 K1SRv2	MSP2 Dd2		
MSP1-19mut34			
MSP1-19 2B			
PfMSP1_19			
Proteínas de transcripción temprana, Surfinas y Proteinas hipotéticas			
Etramp 11.1 Ag 1		Surfin4.2 [K1C]	
Etramp 4 antigen 1		Surfin4.2 [conserved]	
Etramp 5 Ag 1		Surfin4.2 [3D7C]	
Etramp 2 Ag 2		Surfin4.2 [3D7B]	
Etramp 5 Ag 2		Surfin4.2 [K1A]	
Etramp 2 Ag 1		Surfin4.2 [K1B]	
Etramp 4 Ag 2			
Etramp 14.1 Ag 1		Hyp 2	
Etramp 10.1			

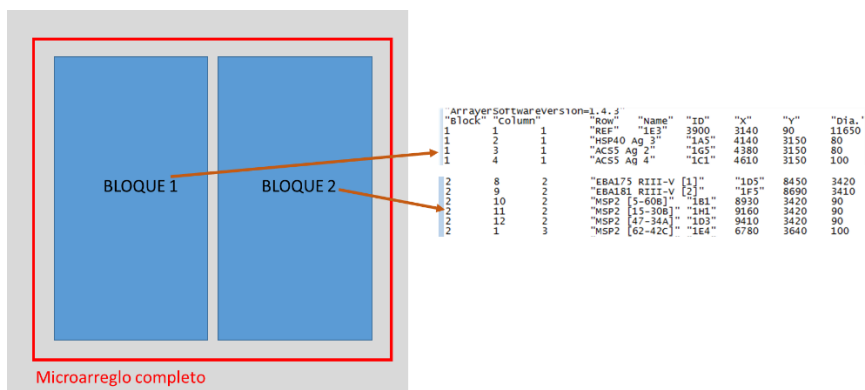
**Tabla 4-2:** (Continuación)

Otras proteínas y péptidos			
Pep18 2mg/ml	PF10_0350_B	EPF1v2	GAMA-A
Pep18 1mg/ml	PF10_0350A	Rh 4.9	GLURP R0
Pep18 0.5mg/ml	Pf3D7_0424900	Rh5	GLURP R2
Pep24 2mg/ml	PF10_0348 C-term	Rh5 SD	CSP
Pep24 1mg/ml	PF10_0348 N-term	RiPR SD	CyRPA SD
Pep24 0.5mg/ml	PF10_0355 C-term	ACBP	
Pep25 2mg/ml	PF10_0355 N-term	PfSEA-1	EBA140 RIII-V
Pep25 1mg/ml	PF10_0351 Repeat	PV1	EBA175 RIII-V [1]
Pep25 0.5mg/ml	PF3D7_1419400 F3 [1]	REX 3	EBA181 RIII-V [2]
Pep26 2mg/ml	Pf1103800 #6	gSG6_protein	EBA175RII_F2
Pep26 1mg/ml	Pf1103800 #7	GEXP18	
Pep26 0.5mg/ml	Pf0826100	SBP1	
	Pf3D7_0402000	HSP40 Ag 3	
	Pf3D7_0425400	ACS5 Ag 2	
	Pf3D7_0601700	ACS5 Ag 4	
	Pf3D7_1353100	ACS5 Ag 3	
	PF10_0351 C-term	HSP40 Ag 1	
		MR321	
		MR152	

#### 4.2.5 Micromatriz (microarray) de proteínas y predicción de la exposición a la malaria

Se construyeron micromatrices (microarrays) de proteínas a partir de 116 antígenos seleccionados. En la Figura 4-1 se observa el esquema correspondiente a la micromatriz. Cada micromatriz estaba constituida por dos bloques y en los dos bloques estaba distribuida la totalidad de los antígenos. Cada lámina contenía 16 micromatrices, (32 bloques) y cada micromatriz correspondió a una muestra de suero (Anexo G). Los procedimientos correspondientes a la micromatriz de proteínas y análisis de los datos se llevaron a cabo en el laboratorio del departamento de inmunología e infecciones del London School of Hygiene and Tropical Medicine en Londres, Reino Unido.

**Figura 4-1:** Estructura de la micromatriz (microarray) de proteínas.



En el costado izquierdo de la imagen se encuentra el esquema de cada micromatriz (microarray). Los dos bloques corresponden a una micromatriz. En el costado derecho de la imagen se encuentran los datos de identificación de cada proteína (antígeno) ubicada en cada bloque. Estos datos corresponden a los registros que se ingresan al software para el proceso de impresión de las proteínas (antígenos).

### 4.2.6 Análisis de imágenes de las micromatrices y normalización de datos

Las imágenes se procesaron en el programa GenePix 4200AL (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) y la intensidad de fluorescencia fue cuantificada con el software ScanArray Express (Perkin) Elmer, Waltham, MA. El análisis de los resultados fue realizado en el programa R 3.1.0. A la intensidad media de fluorescencia (MFI, por sus iniciales en inglés) de cada muestra, se le restó la intensidad media obtenida del plásmido vector vacío (en ausencia del gen codificante para el antígeno) para eliminar la reactividad de fondo. Los resultados fueron transformados con la fórmula de logaritmo base 2 y una muestra se consideró reactiva cuando el resultado de la transformación logarítmica fue mayor a 3 desviaciones estándar del valor de la señal media del buffer control en la micromatriz. Los análisis se centraron en aquellos antígenos que reaccionaron con un mínimo de 5% de las muestras (King CL, et al., 2015).

### 4.2.7 Análisis estadístico

Para el modelo multivariable con regresión logística se construyó la variable dependiente binomial “respuesta serológica” y las variables independientes correspondieron a las variables demográficas, antecedentes y pruebas de laboratorio. Este modelo permitió

evaluar cuáles variables se relacionan con la mayor o menor proporción de seropositividad. Dado que no existió jerarquización predeterminada de las variables se decidió utilizar un modelo automático de análisis como el modelo “stepwise” (paso a paso) con una probabilidad de retiro de 0,2 (Steyerberg EW, et al., 1999). El objetivo del modelo “paso a paso” fue seleccionar dentro del grupo de variables independientes aquellas que explicaran de mejor manera a la variable dependiente. Se introdujeron en el paquete estadístico aquellas variables cuyo valor de “p” en el análisis bivariado fue menor o igual a 0,2 y así se garantizó que las variables seleccionadas fuesen significativas en conjunto. Con el criterio de exclusión (probabilidad de retiro de 0,2) se garantizó que una variable seleccionada no fuese redundante en el modelo completo. Al final del procedimiento se valoró la bondad de ajuste (modelo Hosmer Lemeshow), con el fin de determinar si el modelo final fue adecuado o no. Los análisis univariado, bivariado y multivariable se llevaron a cabo en el programa Stata 14.0.

## **4.3 Resultados**

### **4.3.1 Características demográficas y parasitológicas de los individuos seleccionados**

Un total de 1003 individuos fueron evaluados, de los cuales 772 (77%) procedían de Santa Mónica, Guapi, Cauca, incluidos en el estudio durante los años 2015 y 2016 y 231 (23%) procedían de El Cuerval, Timbiquí, Cauca, incluidos en el estudio en los años 2015 y 2017. Estos 1003 individuos forman parte de las muestras seleccionadas para la estimación de la prevalencia de la malaria subclínica y asintomática descrita y analizada en el primer capítulo del presente documento. Es importante aclarar que no se llevó a cabo un estudio de cohorte, no se realizó seguimiento y se conservó el primer dato de todos aquellos individuos que por el azar estuvieran presentes en más de uno de los seis muestreos realizados, para asegurar que no hubiesen individuos duplicados.

Con el fin de establecer las diferencias en la respuesta serológica en diferentes momentos epidemiológicos para malaria durante el año, se construyó la variable año endémico y epidémico, de acuerdo con los reportes de la situación de malaria en el municipio de Guapi y en la localidad de El Cuerval, lo cual para el presente estudio correspondió a los años 2015 (año endémico) y 2016 (año epidémico) para Guapi y 2017 (año endémico) y 2015 (año epidémico) para El Cuerval, como se explicó en el primer

capítulo del presente documento. Se identificó un porcentaje similar de hombres (50,3%) y mujeres (49,7%) entre las 1003 personas evaluadas, siendo más frecuentes los individuos mayores de 20 años (48,3%) y la población de raza negra (99,1%). Las casas ubicadas en bajo riesgo de transmisión para malaria fueron las más frecuentes (39,5%). El mayor porcentaje (45,9%) de los individuos vivían en el lugar de estudio desde hacía menos de 5 años. La frecuencia más alta (80,3%) de afiliación al Sistema de Salud Colombiano fue al régimen subsidiado. El mayor porcentaje (74,9%) de los individuos desempeñaba actividades de bajo riesgo de exposición a la malaria, es decir, eran estudiantes, amas de casa, empleados o pensionados o adultos mayores o menores de edad no escolarizados. El mayor porcentaje (84,8%) de los individuos usaba el toldillo de forma habitual. En la población de estudio, la frecuencia de individuos que manifestó haber sufrido de malaria previamente (49,4%) fue muy similar a la de aquellos que no presentaron este antecedente (48,8%). Se identificaron bajos porcentajes de infección asintomática diagnosticadas tanto por microscopia como por PCR (1,3% y 1,9% respectivamente) en el día 0, todas ellas causadas por *P. falciparum*. El mayor porcentaje (52,5%) de las muestras fueron recolectadas durante momentos epidémicos para malaria. La descripción general de las características demográficas y parasitológicas en la población de estudio se resumen en la Tabla 4-3.

**Tabla 2-3:** Características demográficas y parasitológicas de la población de estudio. Santa Mónica y El Cuerval, Cauca. 2015- 2017.

	Población de estudio N=1003 n (%)
Género	
Femenino	498 (49,7)
Masculino	505 (50,3)
Edad (años)	
2 a 9	220 (21,9)
10 a 19	299 (29,8)
20 o más	484 (48,3)
Raza	
Negra	994 (99,1)
Mestiza	9 (0,9)
Ubicación de la vivienda	
Riesgo bajo	396 (39,5)
Riesgo intermedio	254 (25,3)
Riesgo alto	353 (35,2)
Años viviendo en la casa	
0 a 5	460 (45,9)
6 a 9	231 (23)
10 o más	312 (31,1)

Tabla 4-3:(Continuación)

	Población de estudio N=1003 n (%)
Sistema de Salud	
Contributivo	77 (7,7)
Subsidiado	806 (80,3)
Sin afiliación	120 (12)
Ocupación	
Riesgo bajo	751 (74,9)
Riesgo intermedio	137 (13,7)
Riesgo alto	115 (11,4)
Antecedente de malaria	
Sí	495 (49,4)
Ns/Nr	18 (1,8)
No	490 (48,8)
Uso de toldillo	
Sí	846 (84,4)
Ns/Nr	11 (1,1)
No	146 (14,6)
Año muestreo	
Endémico	476 (47,5)
Epidémico	527 (52,5)
Localidad	
Santa Mónica, Guapi	772 (77)
El Cuerval, Timbiquí	231 (23)
*Infección asintomática. Parasitemia asexual. Día 0	
Negativo	990 (98,7)
Positivo	13 (1,3)
*Infección asintomática. Parasitemia sexual. Día 0	
Negativo	996 (99,3)
Positivo	7 (0,7)
*Infección asintomática. PCR. Día 0	
Negativo	994 (98,1)
Positivo	19 (1,9)

\* Todas las infecciones asintomáticas diagnosticadas por microscopía y PCR en el día 0 fueron causadas por *P. falciparum*.



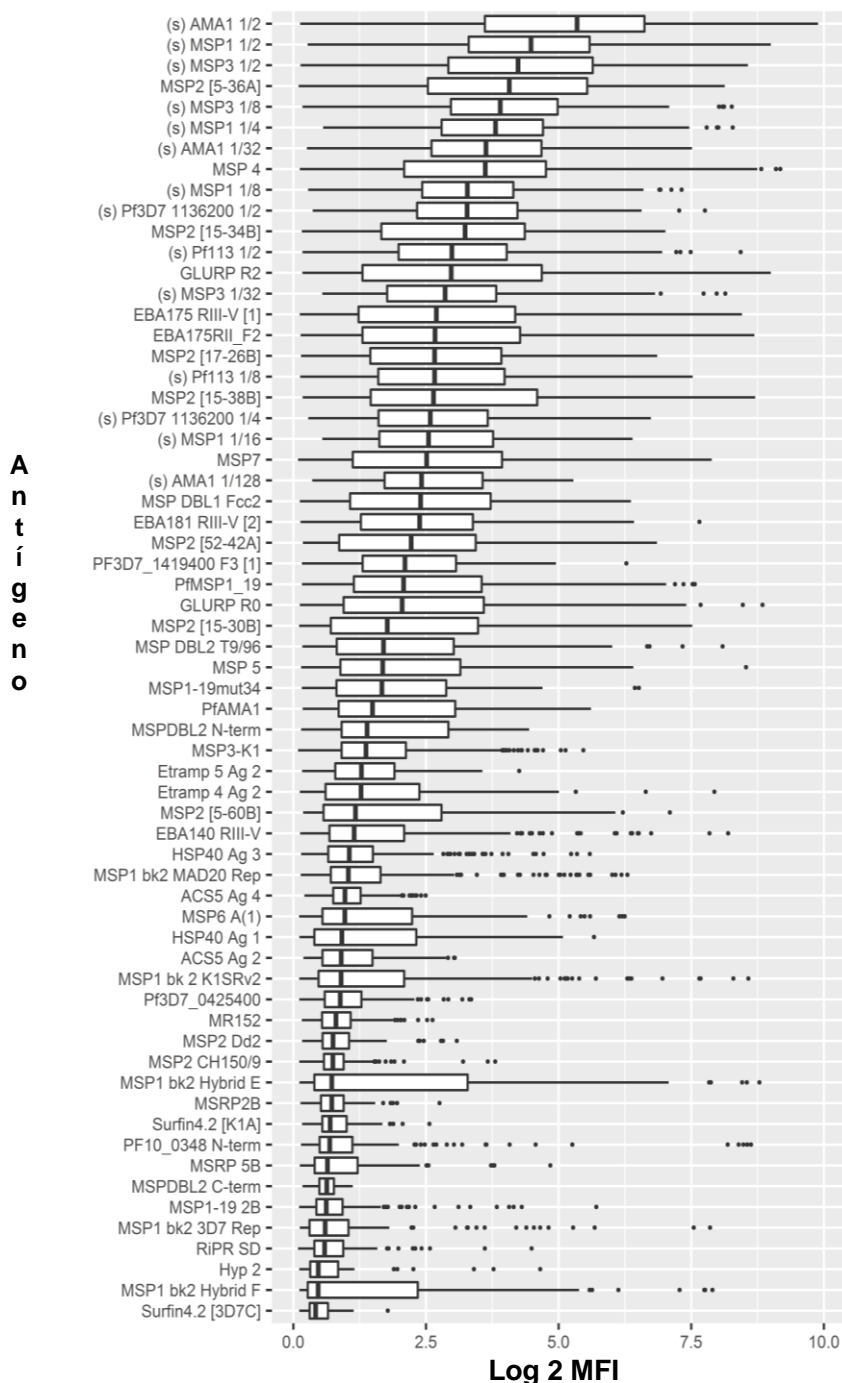
### 4.3.2 Descripción de la reactividad a los antígenos de *P. falciparum* y *P. vivax*

De los 116 antígenos de *P. falciparum* evaluados, 113 (97,4%) presentaron reactividad en la población de estudio, es decir, al menos una persona fue reactiva para un antígeno y de los 12 antígenos de *P. vivax* evaluados, 11 presentaron reactividad (91,7%); es decir, al menos una persona fue reactiva para un antígeno. El punto de corte de positividad se definió como 3 desviaciones estándar por encima del valor de la señal media del buffer control en la matriz. Los 54 antígenos de *P. falciparum* con la mayor reactividad, expresada como el logaritmo en base 2 de la intensidad media de fluorescencia (MFI) se muestran en la Figura 4-2.

El antígeno de *P. falciparum* con mayor número de muestras reactivas (49,4%, 495/1003) en la población de estudio fue el epítoto PfMSP2 [15-38B], mientras que el de *P. vivax* fue PvARP2 ½(s) (9,9%, 99/1003). Los antígenos de *P. falciparum* que presentaron reactividad en 50 o más individuos evaluados y los de *P. vivax* que presentaron reactividad en 30 o más individuos evaluados se presentan en la Figura 4-3.

En el día 0 del estudio se identificaron 11 individuos asintomáticos con infección diagnosticada tanto por microscopía como por PCR; 8 individuos asintomáticos submicroscópicos y 2 individuos asintomáticos positivos por microscopía, pero negativos por PCR. Es decir, hubo en total 21 individuos con infección subclínica (pues algunos desarrollaron síntomas antes del día 14) o asintomática (solo 3 persistieron asintomáticos durante 14 días), todos ellos por *P. falciparum*. Los 21 individuos fueron reactivos a 69 de los 116 antígenos de *P. falciparum* evaluados; los antígenos con mayor reactividad en este grupo fueron: PfGLURP R2 (85,7%, 18/21); PfAMA1 (1/2s) (76,2%, 16/21); PfMSP3 (1/2s) (76,2%, 16/21); PfMSP1 (1/2s) (71,4%, 15/21); PfMSP2 [5-36A] (66,7%, 14/21); PfMSP4 (61,9%, 13/21); PfMSP2 [15-38] (61,9%, 13/21); Pf113 (1/2s) (47,6%, 10/21) y PfMSP1-19 (47,6%, 10/21). De estos 21 individuos con infección subclínica o asintomática por *P. falciparum*, seis fueron reactivos a 4 de los 12 antígenos de *P. vivax* evaluados; PvARP2 (1/2s) (23,8%, 5/21); PvGAMA (s) (19%, 4/21); PvDBP (4,8%, 1/21) y Pv12 (1/2s) (4,8%, 1/21).

**Figura 4-2:** Antígenos de *P. falciparum* reactivos en la población evaluada. Santa Mónica y El Cuerval, Cauca. 2015- 2017.

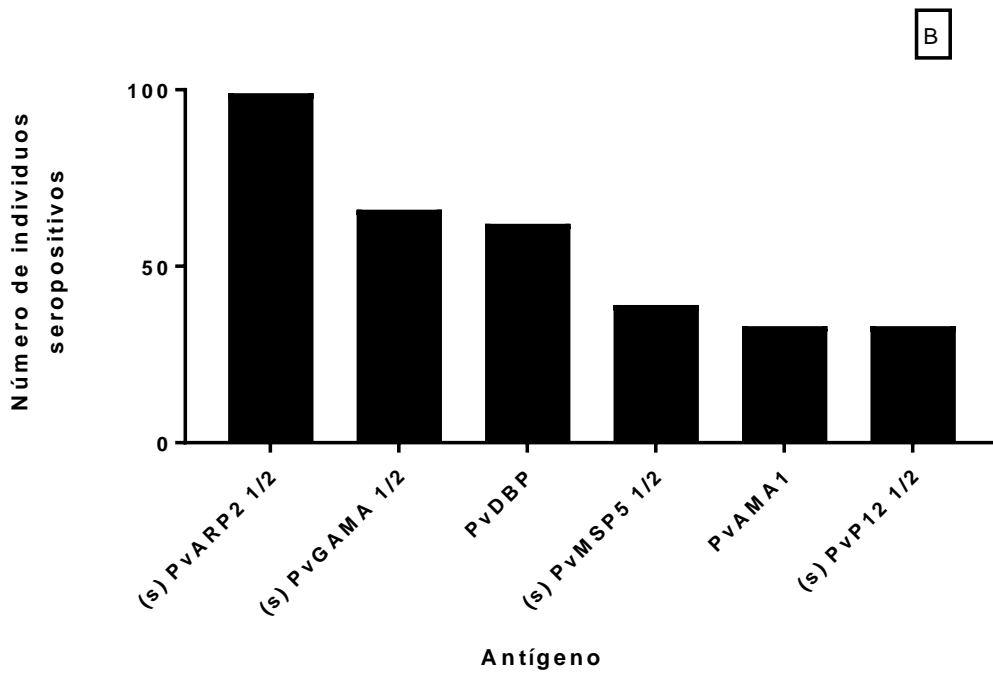
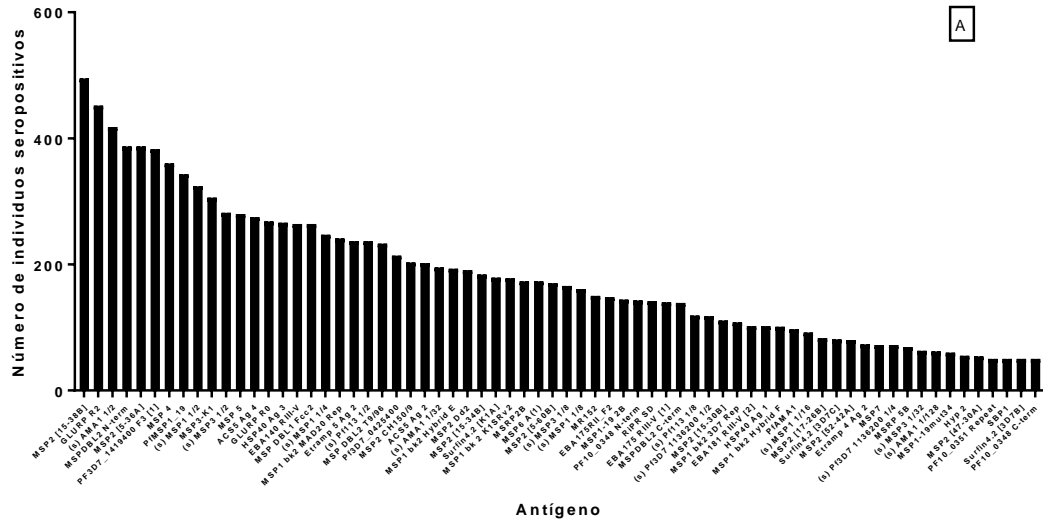


Log<sub>2</sub> MFI = Logaritmo en base 2 de la intensidad media de fluorescencia. Para cada antígeno se presenta la mediana y el rango intercuartílico.

(s)=Corresponde a aquellos antígenos producidos en el Wellcome Sanger Institute.

Las fracciones corresponden a las diluciones realizadas al antígeno correspondiente y son las diluciones en las cuales el antígeno presentó reactividad.

**Figura 4-3:** Antígenos de *P. falciparum* y *P. vivax* con mayor reactividad en la población evaluada. Santa Mónica y El Cuerval, Cauca. 2015- 2017. A: Antígenos de *P. falciparum*. B: Antígenos de *P. vivax*.



### 4.3.3 Definición de la variable dependiente “respuesta serológica”

Para el análisis univariado, bivariado y multivariable se construyeron las variables dependientes binomiales “respuesta serológica a *P. falciparum*” y “respuesta serológica a *P. vivax*”, utilizando antígenos o epítopes de las dos especies. Con el fin de reducir la posibilidad de reacción cruzada, la respuesta serológica a *P. falciparum* incluyó la reactividad a 6 epítopes antigénicos de PfMSP2 (MSP2 [15-38 B], MSP2 [5-60B], MSP2 [15-34B], MSP2 [5-36A]), los cuales son variantes repetidas de MSP2 y representan variantes alélicas procedentes de pacientes de Ghana (Duah NO, et al., 2009). De igual forma se seleccionaron los epítopes altamente específicos de PfMSP1 bloque 2 (MSP1 bk2 Hybrid E [hibrido sintético] y MSP1 bk2 MAD20 Rep [región repetida de MAD20]) (Gray JC, et al., 2007). Para *P. vivax* se seleccionó PvDBP por tener el más bajo porcentaje de identidad: PvRII (DBP) (25% de identidad de secuencia) o 239 de los 967 aminoácidos de su ortólogo en *P. falciparum* (Hostetler JB, 2015). Los epítopes o antígenos seleccionados para la construcción de la variable “respuesta serológica” y sus características generales se presentan en la Tabla 4-4.

**Tabla 4-4:** Antígenos de *P. vivax* y *P. falciparum* usados en la construcción de la variable dependiente “respuesta serológica”. Características generales y sus respectivos ortólogos.

Ag. en <i>P. vivax</i>	Producto	Número de identificación	Homologo u ortólogo en <i>P. falciparum</i>	Características del ortólogo	*Antígeno o epítope
DBP	Proteína de unión al receptor Duffy	PVX_110810	PF3D7_0102500 PF3D7_0424300 PF3D7_0731500 PF3D7_1301600	Antígeno de unión al eritrocito	PvDBP

Ag. en <i>P. falciparum</i>	Producto	Número de identificación	Homologo u ortólogo en <i>P. vivax</i>	Características del ortólogo	*Antígeno o epítope
MSP2	Proteína de superficie del merozoíto 2	PF3D7_0206800	No identificado		PfMSP2 [15-38 B], PfMSP2 [5-60B], PfMSP2 [15-34B], PfMSP2 [5-36A],
MSP1	Proteína de superficie del merozoíto 1	PF3D7_0930300	PVP01_0728900 PVX_099980	Proteína de superficie del merozoíto 1	PfMSP1 bk2 Hybrid E, PfMSP1 bk2 MAD20

\* = Usados para la construcción de la variable dependiente “respuesta serológica”.

De los 1003 individuos evaluados, 56% (562/1003) fueron reactivos a por lo menos uno de los 6 epítopes antigénicos de *P. falciparum* seleccionados y se consideraron seropositivos para el análisis. De igual forma, 6,2% (62/1003) de los individuos fueron reactivos a PvDBP y se consideraron seropositivos para *P. vivax* en el análisis.

#### **4.3.4 Modelo de predicción de seropositividad a la infección malárica**

##### **▪ Asociación con la variable “respuesta serológica”**

La comparación de las variables demográficas y los resultados del laboratorio con la variable respuesta serológica para *P. falciparum* evidenció asociación estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) con la edad, el tiempo viviendo en la vivienda, la ocupación, el antecedente de malaria previo, la localidad de origen y el resultado en la gota gruesa (parasitemia asexual) para el diagnóstico de la malaria asintomática. Por su parte, en el caso de la variable respuesta serológica para *P. vivax*, no se evidenció asociación estadísticamente significativa con ninguna variable.

Con respecto a las variables con asociación estadísticamente significativa, se encontró que la seropositividad por *P. falciparum* fue 2,8 veces mayor en individuos mayores de 20 años en comparación con los menores de 9 años. La seropositividad por *P. falciparum* fue 1,8 y 2,9 veces mayor en individuos que desarrollaban trabajos con riesgo intermedio y alto en comparación con aquellos que desarrollaban un trabajo con bajo riesgo de exposición.

La seropositividad para *P. falciparum* fue 2 veces mayor en aquellos individuos que presentaron antecedente de infección malárica previa con respecto a los que manifestaron no haber sufrido de malaria previamente. En el caso de *P. falciparum*, la seropositividad fue 2 veces mayor en individuos que vivían hace más de 10 años en la vivienda comparado con aquellos que vivían desde hacía menos de 5 años en el lugar. En cuanto a las pruebas de laboratorio para el diagnóstico de la malaria asintomática, la

seropositividad por *P. falciparum* fue 9,6 veces mayor en individuos con parasitemia asexual comparado con aquellos negativos por microscopía. Es necesario aclarar que la precisión del estimador no es adecuada, dada la magnitud del intervalo de confianza.

Particularmente para *P. falciparum*, la seropositividad fue 30% menos frecuente en Santa Mónica que en El Cuerval, es decir, esta seropositividad fue 1,4 [1,1-2 (IC95%)] veces mayor en El Cuerval que en Santa Mónica. Para las demás variables no se identificó asociación estadísticamente significativa ni para la seropositividad por *P. falciparum* ni por *P. vivax*.

Es importante resaltar que no se identificó asociación estadísticamente significativa entre la seropositividad por las dos especies y el año endémico o epidémico para malaria durante el desarrollo del trabajo. El resumen del análisis bivariado se presenta en la Tabla 4-5.

Como se mencionó anteriormente, el estudio se llevó a cabo en dos lugares con características ecoepidemiológicas diferentes, Santa Mónica en zona urbana de Guapi y El Cuerval en zona rural de Timbiquí; por lo tanto, fue importante conocer las seroprevalencias en cada uno de ellos.

En Santa Mónica, el porcentaje de seroprevalencia de infección por *P. falciparum* fue de 54,3% (419/772) y por *P. vivax* fue de 5,7% (44/772); en El Cuerval, el porcentaje de seroprevalencia de infección por *P. falciparum* fue de 61,9% (143/231) y por *P. vivax* de 7,8% (18/231) con diferencia estadísticamente significativa solo para seroprevalencia por *P. falciparum* ( $\chi^2$ : 4,2 [p= 0,04] para *P. falciparum* y  $\chi^2$ :1,4 [p = 0,2] para *P. vivax*).

**Tabla 4-5:** Distribución de los seropositivos para *P. falciparum* y para *P. vivax* de acuerdo con las variables demográficas, antecedentes y de laboratorio. Santa Mónica y El Cuerval, Cauca. 2015- 2017.

	Seropositivo <i>P. falciparum</i> . N=562 n (%)	OR crudo (IC 95%)	Seropositivo <i>P. vivax</i> . N=62 n (%)	OR crudo (IC 95%)
Género				
Femenino	276 (49,1)	0,9 (0,7-1,2)	33 (53,2)	1,2 (0,7-1,9)
Masculino	286 (50,9)	1	29 (46,8)	1
Edad (años)				
2 a 9	94 (16,7)	1	11 (17,7)	1
10 a 19	141 (25,1)	1,2 (0,8-1,7)	8 (12,9)	1,9 (0,9-3,7)
20 o más	327 (58,2)	<b>2,8 (2-3,9)*</b>	43 (69,4)	0,5 (0,2-1,3)
Raza				
Negra	556 (98,9)	0,6 (0,2-2,6)	61 (98,4)	0,5 (0,1-4,2)
Mestiza	6 (1,1)	1	1 (1,6)	1
Ubicación vivienda				
Riesgo bajo	230 (40,9)	1	25 (40,3)	1
Riesgo intermedio	148 (26,3)	1 (0,7-1,4)	21 (33,9)	1,3 (0,7-2,4)
Riesgo alto	184 (32,7)	0,8 (0,6-1,1)	16 (25,8)	0,7 (0,4-1,3)
Años viviendo en la casa				
0 a 5	228 (40,6)	1	23 (37,1)	1
6 a 9	128 (22,8)	1,2 (0,9-1,7)	14 (22,6)	1,2 (0,6-2,4)
10 o más	206 (36,7)	<b>2 (1,5-2,7)*</b>	25 (40,3)	1,7 (0,9-3)
Sistema de Salud				
Contributivo	40 (7,1)	1	3 (4,8)	1
Subsidiado	455 (81)	1,2 (0,8-1,9)	53 (85,5)	1,7 (0,5-5,7)
No afiliación	67 (11,9)	1,2 (0,7-2,1)	6 (9,7)	1,3 (0,3-5,4)
Ocupación				
Riesgo bajo	386 (68,7)	1	42 (67,8)	1
Riesgo intermedio	89 (15,8)	<b>1,8 (1,2-2,6)*</b>	10 (16,1)	1,3 (0,7-2,7)
Riesgo alto	87 (15,5)	<b>2,9 (1,9-4,6)*</b>	10 (16,1)	1,6 (0,7-3,3)
Antecedente de malaria				
Sí	320 (57)	<b>2 (1,5-2,6)*</b>	38 (61,3)	1,7 (0,9-2,9)
Ns/Nr	8 (1,4)	0,9 (0,3-2,3)	1 (1,6)	1,2 (0,2-9,4)
No	234 (41,6)	1	23 (37,1)	1
Uso de toldillo				
Sí	475 (84,5)	1	53 (85,5)	1
Ns/Nr	6 (1,1)	0,9 (0,3-3,1)	1 (1,6)	1,5 (0,2-11,9)
No	81 (14,4)	1 (0,7-1,4)	8 (12,9)	0,9 (0,4-1,9)

**Tabla 4-5:** (Continuación).

	Seropositivo <i>P. falciparum</i> . N=562 n (%)	OR crudo (IC 95%)	Seropositivo <i>P. vivax</i> . N=62 n (%)	OR crudo (IC 95%)
Año muestreo				
Endémico	268 (47,7)	0,9 (0,8-1,3)	30 (48,4)	1
Epidémico	294 (52,3)	1	32 (51,6)	0,9 (0,6-1,6)
Parasitemia asexual				
Negativo	550 (97,9)	1	62 (100)	1
Positivo	12 (2,1)	<b>9,6 (1,2-74,1)*</b>	0 (0)	Omitido <sup>α</sup>
Parasitemia sexual				
Negativo	556 (98,9)	1	62 (100)	1
Positivo	6 (1,1)	4,7 (0,6-39,6)	0 (0)	Omitido <sup>α</sup>
PCR				
Negativo	547 (97,3)	1	61 (98,4)	1
Positivo	15 (2,7)	2,9 (0,9-9,1)	1 (1,6)	0,8 (0,1-6,4)
Localidad				
Santa Mónica, Guapi	419 (74,6)	<b>0,7 (0,5-0,9)*</b>	44 (71)	0,7 (0,4-1,3)
El Cuerval	143 (25,4)	1	18 (29)	1

\*En negrilla se identifican los OR estadísticamente significativos en el grupo de seropositivos para *P. falciparum* y el grupo de seropositivos para *P. vivax*.

Ns/Nr = No sabe/ No responde

IC = Intervalo de confianza. OR = Razón de Odds.

<sup>α</sup> = No se calcula el estimador debido a la presencia de "0" en la tabla de contingencia.

### ▪ Análisis multivariable

En el análisis multivariable se incluyeron las variables que en el análisis bivariado presentaron un valor de "p" menor o igual a 0,2 y para la aplicación del modelo stepwise se asignó una probabilidad de retiro de 0,2.

El modelo que mejor predijo el desarrollo de seropositividad para *P. falciparum* incluyó las variables edad, tiempo viviendo en la residencia, ocupación, antecedente previo de malaria y presencia de parasitemia asexual en la gota gruesa. Habiendo ajustado por las otras variables del modelo se pudo inferir que la seropositividad por *P. falciparum* fue 1,9 veces mayor en individuos mayores de 20 años comparado con los menores de 9 años; 1,6 veces mayor en personas que llevaban viviendo en la vivienda más de 10 años comparado con aquellos que vivían en el lugar de residencia durante 5 años; 1,7 veces mayor en personas que desarrollaban trabajos de riesgo alto de exposición a la malaria, comparado con aquellos que desarrollaban trabajos de riesgo bajo y 1,4 veces mayor en individuos que manifestaron haber presentado malaria previamente en comparación con aquellos que no la tuvieron. En cuanto a la presencia de parasitemia asexual por



microscopía, la seropositividad por *P. falciparum* fue 14 veces mayor en individuos que la presentaban comparado con aquellos que no la tenían, pero la magnitud del intervalo de confianza afecta la precisión del estimador. Estos datos se resumen en la Tabla 4-6.

En el caso de *P. vivax*, el modelo que mejor predijo el desarrollo de seropositividad incluyó las variables edad y ubicación de la vivienda, pero no se identificó asociación estadísticamente significativa con ninguna de ellas. Estos datos se resumen en la Tabla 4-6.

**Tabla 4-6.** Modelo que mejor predice la seropositividad para *P. falciparum* y *P. vivax*. Santa Mónica y El Cuerval, Cauca. 2015- 2017.

Seropositividad <i>P. falciparum</i>	OR ajustado	IC 95%
Edad		
2 a 9 años	1	
10 a 19 años	0,9	0,6 – 1,4
Mayor de 20 años	1,9	<b>1,3 – 2,8*</b>
Tiempo viviendo en casa		
0 a 5 años	1	
6 a 9 años	1,2	0,9 – 1,7
Más de 10 años	1,6	<b>1,1 – 2,2*</b>
Ocupación		
Riesgo bajo	1	
Riesgo intermedio	1	0,6 – 1,5
Riesgo alto	1,7	<b>1 – 2,7*</b>
Antecedente previo de malaria		
No	1	
Ns/Nr	0,8	0,3 – 2,2
Si	1,4	<b>1,1 – 2*</b>
Parasitemia asexual		
Negativa	1	
Positiva	14	<b>1,8 – 113,1*</b>
Seropositividad <i>P. vivax</i>	OR ajustado	IC 95%
Edad		
2 a 9 años	1	
10 a 19 años	0,5	0,2 – 1,3
Mayor de 20 años	1,8	0,9 – 3,6
Ubicación de la vivienda		
Riesgo bajo	1	
Riesgo intermedio	1,3	0,7 – 2,4
Riesgo alto	0,7	0,4 – 1,4

\*Subrayado y en negrilla se identifican los OR estadísticamente significativos en el grupo de seropositivos para *P. falciparum* y el grupo de seropositivos para *P. vivax*.

IC = Intervalo de confianza. OR = Razón de Odds.

Se realizó la prueba de bondad de ajuste usando el modelo Hosmer Lemeshow, encontrándose un ajuste adecuado tanto para la seropositividad por *P. falciparum* [ $\chi^2$ : 14,9 (p = 0,06)], como por *P. vivax* [ $\chi^2$ : 2 (p = 0,9)].

## 4.4 Discusión

La evaluación serológica realizada en Santa Mónica, Guapi-Cauca y El Cuerval, Timbiquí-Cauca entre 2015 y 2017 detectó diferentes niveles de serorreactividad a la infección por *P. falciparum* (56%, 562/1003) y *P. vivax* (6,2%, 62/1003), lo cual demuestra exposición previa de la población a la infección malárica. Es importante resaltar que aunque el comportamiento epidemiológico de la malaria en esta región evidencia una frecuencia alta y casi exclusiva de infección por *P. falciparum*, se detectó seropositividad a *P. vivax*, lo cual sugiere la posibilidad de reactividad cruzada principalmente con los antígenos de *P. vivax* o la circulación de este parásito en la región. Adicionalmente, el análisis del modelo de predicción de seropositividad a la infección malárica guarda importantes similitudes con lo reportado previamente en la literatura.

El principal objetivo fue determinar los grupos de riesgo para la infección por malaria. El uso de marcadores serológicos ha sido usado para determinar factores de riesgo y dinámicas de transmisión en malaria (Esposito F, et al., 1988; Ramasamy R, et al., 1994; Corran P, et al., 2007; Rosas-Aguirre A, et al., 2013; Kano FS, et al., 2012), lo cual permite planear estrategias encaminadas al control y la eliminación o monitorear los cambios en el nivel de transmisión de la enfermedad (Corran P, et al., 2007). En este estudio, el análisis multivariable identificó asociaciones estadísticamente significativas (p<0,05) entre la serorreactividad por *P. falciparum* y la edad, la ocupación, el antecedente de malaria previo, el tiempo viviendo en la vivienda y el resultado de la parasitemia asexual en la gota gruesa para el diagnóstico de la malaria asintomática. Sin embargo, para la serorreactividad por *P. vivax* no se identificó asociación estadísticamente significativa (p<0,05) con ninguna de las variables explicativas del modelo.

Como se expuso en los resultados, el porcentaje de seropositividad para *P. falciparum* es más alto y con mayor asociación en población por encima de los 20 años de edad (1,9 veces mayor comparado con los menores de 9 años de edad), lo cual indica que el nivel

de exposición aumenta con la edad y además, como se ha descrito en varios estudios, la adquisición de la inmunidad es dependiente de esta (Greenwood BM, 1987; Artavanis-Tsakonas K, et al., 2003). Es por esta razón que los niños menores de 6 meses que han perdido la protección de los anticuerpos transmitidos por la madre son población de alto riesgo de morbi-mortalidad por malaria, al igual que los menores de 5 años quienes no han logrado desarrollar la inmunidad parcialmente protectora (Phillips M, et al., 2017). El desarrollo de esta inmunidad parcialmente protectora requiere de exposiciones repetidas al parásito y reduce el riesgo de infecciones complicadas y por lo tanto mortales (Dondorp AM, 2008). Este patrón de adquisición de inmunidad es mucho más claro en zonas de alta transmisión para malaria comparado con zonas de baja transmisión (Stanisic DI, et al., 2015). En la sección sobre la caracterización de la infección asintomática en el presente estudio y que corresponde a la población a partir de la cual se desarrolló el presente análisis de seroprevalencia, se evidenció que 14,8% de las personas encuestadas (100 de los 676 individuos con antecedente de malaria previo), manifestó haber sido hospitalizada durante alguno de los episodios anteriores de malaria, sin tener un patrón de edad característico para este antecedente; esto indica de forma indirecta acerca de posibles casos de malaria complicada en la población de estudio, en diferentes rangos de edad y en una zona en la cual la infección por *P. falciparum* es la más frecuente, como sucede en Región Pacífica colombiana.

Estudios anteriores evidencian que los individuos adquieren inmunidad contra *P. vivax* más rápidamente que contra *P. falciparum*, independientemente del nivel de transmisión de la malaria en la región (Mueller I, et al., 2013). En el presente estudio no se encontró diferencia estadística entre las proporciones de seropositivos por *P. vivax* en los diferentes grupos de edad, lo cual indicaría que no existe un patrón distintivo de adquisición de inmunidad en diferentes edades para éste parásito en esta muestra.

En estudios previos se ha concluido que la infección malárica se asocia con actividades laborales que incrementan la posibilidad de exposición a la picadura del vector, como el desarrollo de ocupaciones al aire libre que están estrechamente relacionadas con la agricultura, la minería y la pesca (Castro MC, 2017). De forma similar, en el presente estudio se identificó una asociación estadísticamente significativa y con riesgo 1,7 veces mayor entre la seropositividad por *P. falciparum* y el desarrollo de este tipo de actividades laborales.

Es importante aclarar que aunque la mayoría de los individuos encuestados en el presente estudio manifestaron ser estudiantes, las difíciles condiciones económicas de la región obliga a que muchos de ellos en sus periodos de vacaciones escolares se dediquen a la pesca, recolección de diferentes especies de moluscos en el manglar o a la minería, apoyando los ingresos económicos de su núcleo familiar. En la Región Pacífica colombiana la captura de moluscos y cangrejos como actividad económica es desarrollada por niños (estudiantes) y mujeres (amas de casa) y correspondió a uno de los principales factores de exposición a la malaria en comunidades del municipio de Santa Bárbara en el departamento de Nariño, vecinas a Guapi (Escobar JE, 2012). Por este motivo, no se puede descartar el riesgo de exposición en personas que durante la encuesta manifestaron ser estudiantes o amas de casa. Además, teniendo en cuenta que cerca del 50% de la población es menor de 19 años, es posible que presenten algún riesgo de exposición debido a sus actividades no escolares como se explicó anteriormente. En otros estudios se ha identificado asociación de riesgo ocupacional con actividades laborales desarrolladas en bosques (agricultura, extracción maderera o limpieza de terrenos) o actividades urbanas como ser conductor de moto taxi (Vittor AY, et al., 2006; Chuquiyaury R, et al., 2012; Rosas-Aguirre A, et al., 2013).

De acuerdo con los resultados expuestos, el antecedente de haber sufrido de malaria está más estrechamente relacionado con la seropositividad por *P. falciparum* y es 1,4 veces mayor en individuos que manifestaron este antecedente. Las exposiciones repetidas al parásito generan el desarrollo de inmunidad parcialmente protectora y el desarrollo de anticuerpos contra diferentes antígenos parasitarios (Badiane AS, et al., 2013). Es importante resaltar que en este tipo de preguntas el sesgo de memoria o la interpretación de los conceptos podrían afectar la respuesta real. En este caso se tuvo una buena correlación y robustez estadística y cabe resaltar la importancia de validar correctamente este tipo de preguntas en caso de ser incluidas en instrumentos que acompañen el desarrollo de futuros estudios serológicos en programas de vigilancia epidemiológica.

En el análisis multivariable se identificó que las personas que han vivido en la zona durante más de 10 años, presentan un riesgo 1,6 veces mayor de ser seropositivos para *P. falciparum* y aunque en el análisis multivariable no se encontró asociación estadísticamente significativa con la localidad, en los OR crudos esta seropositividad fue 1,4 veces mayor en El Cuerval que en Santa Mónica. Este último es un lugar que alberga

gran proporción de población flotante, lo cual se corrobora con la importante fluctuación en el número de individuos registrados en los diferentes censos realizados antes de los muestreos. En consecuencia, la historia personal frente a la malaria no necesariamente es reflejo de las características de vida en Santa Mónica (Guapi-Cauca) y que por el contrario la exposición a esta enfermedad habría que caracterizarla de forma más individual, de acuerdo con patrones de migración humana, condiciones de vida y factores de exposiciones previos a vivir en Santa Mónica. Aún más, posiblemente este barrio es una zona receptora de población con una historia previa de exposición. La movilidad humana y los procesos de urbanización incrementan las posibilidades de transmisión, principalmente en pequeños centros poblados urbanos que ofrecen mejores condiciones de vida a personas en busca de trabajo, educación o salud (Castro MC, 2017). En Guapi y en la Región del Pacífico caucano existe un fenómeno que se relaciona con la presencia de malaria urbana. En la cabecera municipal de Guapi se encuentran las instituciones educativas de básica primaria, secundaria y la normal y la mayoría de la población escolarizada procede de zonas rurales en las cuales la malaria tiene mayores niveles de prevalencia y la transmisión es constante a lo largo del año. Los profesores manifestaron que buena parte del ausentismo escolar al inicio del año o después de vacaciones está relacionado con casos de malaria en niños procedentes de zonas rurales. De igual forma, los lugares de extracción minera y las zonas de pesca son el origen de casos de malaria diagnosticados en el casco urbano de Guapi. En esta línea, otro estudio, en Quibdó, en la Región Pacífica colombiana demostró que los movimientos temporales de residentes de áreas donde la transmisión de la malaria es mayor a zonas de menor transmisión se han asociado con un aumento en el riesgo, principalmente en escenarios urbanos (Osorio L, et al., 2004).

Un objetivo del presente análisis fue caracterizar la dinámica de transmisión de la malaria en dos lugares con contextos ecoepidemiológicos diferentes: una zona urbana donde se presentan casos (Santa Mónica, Guapi) y otra, El Cuerval, Timbiquí, donde la transmisión es netamente rural. La caracterización de criaderos de *Anopheles* realizada por la Unidad de Entomología de las Secretaría Departamental de Salud del Cauca en el barrio Santa Mónica, Guapi, Cauca en el marco de las actividades del proyecto PAMAFRO en 2011 logró establecer la presencia de dos lagos subutilizados para cría de peces, ubicados en las instalaciones del Hogar Mónica, en el sector de la “L”, zona en la cual están ubicadas las casas con mayor riesgo de transmisión en este barrio. En esos lagos se identificaron

especies potencialmente transmisoras de malaria: *Anopheles albimanus* (96,8%) y *Anopheles neivai* (0,6%). En ese momento, *An. albimanus* presentó la mayor actividad de picadura entre las 22:00 y 02:00 horas. Con estos resultados y con el apoyo del Proyecto Malaria Colombia, la Secretaría Departamental de Salud del Cauca realizó el drenaje de los lagos y la implementación de toldillos tratados con insecticidas a los residentes del Hogar Mónica. De esta manera se logró reducir de forma importante la transmisión de malaria en este barrio, que históricamente aportaba aproximadamente el 40% de los casos de malaria urbana de Guapi (Datos suministrados por la Secretaría Departamental de Salud del Cauca).

Más recientemente, en 2012, la Secretaría Departamental de Salud del Cauca realizó la caracterización ecoepidemiológica de El Cuerval, Timbiquí-Cauca. Esta zona costera de playa está influenciada por el intercambio de aguas producto de las mareas que ascienden y descienden cada seis horas y generan una diferencia en el nivel del agua que oscila entre 3 y 4 metros. La vegetación es típica del bosque lluvioso tropical de la Región Pacífica en la que se encuentran abundantes bromelias epífitas que crecen sobre árboles. Aunque no se han identificado criaderos de anofelinos, ni permanentes, ni artificiales y no se han identificado estados larvales del vector en las bromelias, si se ha identificado en El Cuerval la presencia de *An. neivai*, vector secundario de malaria, cuyos hábitos de vida están estrechamente relacionados con las bromelias como sitios de cría (Ueno HM, et al., 2007). La Unidad de Entomología de la Secretaría Departamental de Salud del Cauca informó en esa época que en El Cuerval también se identificó *An. albimanus* el cual presentó un comportamiento de picadura que iniciaba a las 20:30 horas en el exterior de las viviendas y a las 21:30 horas en el interior. En esa oportunidad, las tasas de picadura de *An. albimanus* en el intradomicilio y el extradomicilio estuvieron en un rango entre 1 y 6,5 mosquitos/hora/hombre y entre 2,3 y 6 mosquitos/hora/hombre respectivamente. Para el caso de *An. neivai* la tasa de picadura (rango entre 1 y 2 mosquitos/hora/hombre) fue constante en el extradomicilio e iniciaba a las 19:30 horas y disminuía a las 23:30 horas; en el interior del domicilio, la tasa de picadura (rango entre 0 y 1,2 mosquitos/hora/hombre) de esta especie iniciaba 19:30 horas, disminuía progresivamente y presentaba un pico hacia la media noche (Datos suministrados por la Secretaría Departamental de Salud del Cauca). Ni en Santa Mónica, Guapi-Cauca, ni en El Cuerval, Timbiquí-Cauca se han realizado estudios de tasa de infectividad y por consiguiente se desconoce la tasa de inoculación entomológica.

En un estudio realizado en 2011 en tres localidades del municipio de Iscuandé en Nariño, vecino de Guapi y con características ecológicas similares a El Cuerval, se determinó que de acuerdo con la tasa de inoculación entomológica una persona en esta región podría recibir 2,3 picaduras infectivas de *An. albimanus*, y 1,8 picaduras infectivas de *An. neivai* durante un año (Escobar JE, 2012). De igual forma, en este estudio se demostró que *An. neivai* juega un papel importante en la transmisión de malaria extradomiciliaria, dada su preferencia de picadura en el extradomicilio, similar a lo identificado por la Unidad de Entomología de la Secretaría Departamental de Salud del Cauca en El Cuerval. En este estudio además se encontró que *An. neivai* estaba infectado por especies de *Plasmodium*, con una tasa de inoculación entomológica un poco inferior a la de *An. albimanus* y un riesgo alto de contacto humano-vector dado las actividades económicas y socio-culturales de los habitantes que aumentan la exposición a este vector en particular (Escobar JE, 2012).

De acuerdo con lo descrito anteriormente, las características ecoepidemiológicas en El Cuerval, Timbiquí-Cauca, ofrecen mejores condiciones para la transmisión de la malaria, comparado con Santa Mónica, Guapi-Cauca y esto se evidencia en los IFA reportados para El Cuerval durante 2017 (10 casos por 1000 habitantes) y 2015 (280 casos por 1000 habitantes). De igual forma, si se compara el porcentaje de seroprevalencia de la infección por *P. falciparum* en Santa Mónica (54,3%; 419/772) con el porcentaje de seroprevalencia de la infección por *P. falciparum* en El Cuerval (61,9%; 143/231), existen diferencias estadísticamente significativas [ $\chi^2$ :4,2 (p= 0,04)], lo cual refuerza la hipótesis de que El Cuerval cuenta con mejores condiciones ecoepidemiológicas de transmisión autóctona de la infección malárica en comparación con Santa Mónica.

Se evidenció una buena correlación entre resultado de la microscopía para el diagnóstico de la malaria asintomática en el día 0 y serología en cuanto a la infección por *P. falciparum*, pero la magnitud del intervalo de confianza reduce la precisión de dicho estimador. Los estudios serológicos no son considerados pruebas diagnósticas en malaria, pero si una herramienta útil para determinar la exposición a la infección y la intensidad de transmisión (Corran P, et al., 2007). En zonas de baja transmisión podrían mejorar los niveles de sensibilidad de diagnóstico de las pruebas rutinarias como la microscopía (Bousema T, et al., 2010). Lo ideal sería tener un sistema de medida que incluya antígenos suficientemente inmunogénicos y específicos, modelos matemáticos que permitan calcular tasas de seroconversión y predecir fluctuaciones de la incidencia

de la enfermedad e incluir este sistema de medida en la vigilancia rutinaria de la malaria a nivel local y regional, con el fin de evaluar cambios en la transmisión producto de la implementación de una estrategia específica (por ejemplo el uso de tratamiento en masa dirigido a puntos calientes), o del cambio climático o cambios medioambientales, entre otros factores. Por ejemplo, en zonas donde se ha eliminado la transmisión por *P. falciparum*, la presencia de anticuerpos contra este parásito podría indicar la existencia de transmisión residual a partir de portadores asintomáticos de la infección que no son detectados por las pruebas rutinarias de diagnóstico (Rosas-Aguirre A, et al., 2013), para lo cual es fundamental contar con un biomarcador serológico de exposición preciso que de cuenta de la tasa de seroconversión y serorreversión.

Una de las grandes dificultades que debe enfrentar la implementación de los estudios serológicos como medida de intensidad de transmisión es la reacción cruzada de los antígenos usados en las pruebas (Bryan D, et al., 2017). Además, esta limitación puede generar graves problemas de interpretación de resultados en zonas de baja transmisión en las cuales la exposición de los individuos no es permanente ni homogénea, al igual que en las zonas donde circulan de forma simultánea mas de una especie causante de malaria en humanos. Ambas condiciones se presentan en la población objeto de estudio del presente trabajo.

En el presente estudio se utilizó un amplio número de antígenos y epítopes antigénicos para evaluar la respuesta de anticuerpos frente a la infección por *P. falciparum* y *P. vivax*. Para la construcción de la variable dependiente “respuesta serológica” se decidió seleccionar un grupo de epítopes antigénicos altamente específicos de *P. falciparum*, como es el caso de MSP2 [15-38 B], MSP2 [5-60B], MSP2 [15-34B], MSP2 [5-36A], que son variantes repetidas de MSP2 y representan variantes alélicas procedentes de pacientes de Ghana (Duah NO, et al., 2009); además, hay que recordar que MSP2 no posee ortólogo identificado en *P. vivax*. Los epítopes, MSP1 bk2 Hybrid E (hibrido sintético) y MSP1 bk2 MAD20 Rep (región repetida de MAD20), hacen parte de epítopes antigénicos de la familia antigénica del bloque 2 de MSP1 altamente específicos de *P. falciparum* (Gray JC, et al., 2007). En el caso de *P. vivax*, la selección del antígeno hacía parte de un grupo de marcadores con baja identidad relativa de secuencias entre las dos especies y se seleccionó a PvDBP por tener el más bajo porcentaje de identidad: PvRII (DBP) con 25% de identidad de secuencia, es decir, 239 de los 967 amino ácidos de su ortólogo en *P. falciparum* (Hostetler JB, 2015).



Aunque PvDBP ha sido utilizado en otros estudios como un marcador adecuado de infección por *P. vivax* (Kano FS, et al., 2012), los resultados del presente estudio hacen pensar que este antígeno no es el mejor marcador de serorreactividad para la infección por este parásito en la Región Pacífica caucana. En el análisis multivariable solo existió asociación estadísticamente significativa de la seropositividad por *P. vivax* con la edad y este análisis no permitió establecer una diferencia clara entre los factores de riesgo asociados a la seropositividad por una u otra especie. Además, cuando se compara la proporción de seroprevalencia de *P. vivax* en las dos localidades analizadas, no se halló diferencia estadísticamente significativa [Santa Mónica: 5,7% (44/772) y El Cuerval 7,8% (18/231);  $\chi^2:1,4$  (p=0,2)]. Es importante recordar, como se mencionó anteriormente, que en esta zona la mayor proporción de casos de malaria es causada por *P. falciparum*. Debido al bajo número de casos de malaria subclínica o asintomática positivos por PCR o por microscopía no se lograron establecer diferencias estadísticamente significativas en la proporción de positividad de los marcadores serológicos para *P. falciparum* y *P. vivax*. Además, es importante tener en cuenta los diferentes niveles de variabilidad genética de PvDBP identificada en la Región de las Américas (Sousa T, et al., 2006; Souza-Silva FA, et al., 2010) que podrían también afectar la baja serorreactividad observada en este estudio.

Debido al bajo número de individuos con infección subclínica o asintomática detectados en el presente estudio, no fue posible realizar un análisis estadístico robusto en relación con la serorreactividad a *P. falciparum* o *P. vivax*. Es importante anotar que los 21 individuos con infección subclínica o asintomática fueron reactivos a 69 de los 116 antígenos evaluados, siendo PfGLURP R2 y PfAMA1 los que presentaron mayor reactividad [(85,7%, 18/21) y (76,2%, 16/21) respectivamente]. Otros estudios han podido determinar diferencias estadísticamente significativas en la intensidad de la respuesta de anticuerpos entre individuos asintomáticos y sintomáticos, reportando mayor reactividad en estos últimos (Baum E, et al., 2016). Además, el antígeno que se ha identificado con mayor frecuencia en la población de individuos asintomáticos en otros estudios es PfAMA1 (Baum E, et al., 2016; Elliott SR, et al., 2014), similar a lo encontrado en el presente trabajo.

En conclusión y con los resultados de la evaluación serológica, se logró determinar que existe exposición previa a la infección malárica en dos contextos ecológicos diferentes de transmisión, uno en zona urbana y otro en zona rural de la Región Pacífica caucana, con

un perfil de factores asociados a la seropositividad por *P. falciparum*. Estos resultados corresponden a la línea de base en términos de seroprevalencia de la infección en la región. Aún se debe refinar el proceso de selección de antígenos como marcadores de exposición, pero este análisis es un comienzo prometedor y da herramientas de comparabilidad con futuros estudios. Nuevas investigaciones deberán evaluar tasas de seroconversión y perfil de antígenos que diferencien infección reciente de pasada. Es necesario que las políticas nacionales incluyan los estudios serológicos como herramientas rutinarias para evaluar la intensidad de la transmisión durante el proceso de pre-eliminación de la malaria en el país.

## Referencias

Addgene, the nonprofit global plasmid repository. [https://www.addgene.org/Julian\\_Rayner/](https://www.addgene.org/Julian_Rayner/)

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 Aug;133(2):145-52.

Badiane AS, Bei AK, Ahouidi AD, Patel SD, Salinas N, Ndiaye D, Sarr O, Ndir O, Tolia NH, Mboup S, et al. Inhibitory humoral responses to the *Plasmodium falciparum* vaccine candidate EBA-175 are independent of the erythrocyte invasion pathway. *Clin Vaccine Immunol*. 2013;20:1238–1245.

Baum E, Sattabongkot J, Sirichaisinthop J, Kiattibutr K, Jain A, Taghavian O, Lee M-Ch, Davies DH, Cui L, Felgner PL, Yan G. 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. doi: 10.1186/s12936-016-1393-4.

Bornhorst JA, Falke JJ. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods Enzymol.* 2000;326:245-54.

Bousema T, Youssef RM, Cook J, Cox J, Alegana VA, Amran J, Noor AM, Snow RW, Drakeley C. Serologic markers for detecting malaria in areas of low endemicity, Somalia, 2008. *Emerg Infect Dis.* 2010 Mar;16(3):392-9. doi: 10.3201/eid1603.090732.

Bryan D, Silva N, Rigsby P, Dougall T, Corran P, Bowyer PW, Ho MM; Collaborative study group. The establishment of a WHO Reference Reagent for anti-malaria (*Plasmodium falciparum*) human serum. *Malar J.* 2017 Aug 5;16(1):314. doi: 10.1186/s12936-017-1958-x.

Castro MC. Malaria Transmission and Prospects for Malaria Eradication: The Role of the Environment. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017 Oct 3;7(10). pii: a025601. doi: 10.1101/cshperspect.a025601.

Chuquiyauri R, Paredes M, Peñataro P, Torres S, Marin S, Tenorio A, Brouwer KC, Abeles S, Llanos-Cuentas A, Gilman RH, Kosek M, Vinetz JM. Socio-demographics and the development of malaria elimination strategies in the low transmission setting. *Acta Trop.* 2012 Mar;121(3):292-302. doi: 10.1016/j.actatropica.2011.11.003. Epub 2011 Nov 15.

Corran P, Coleman P, Riley E, Drakeley C. Serology: a robust indicator of malaria transmission intensity? *Trends Parasitol.* 2007 Dec;23(12):575-82. Epub 2007 Nov 7.

Crosnier C, Wanaguru M, McDade B, Osier FH, Marsh K, Rayner JC, Wright GJ. A library of functional recombinant cell-surface and secreted *P. falciparum* merozoite proteins. *Mol Cell Proteomics.* 2013 Dec;12(12):3976-86. doi: 10.1074/mcp.O113.028357.

Dondorp AM. The relation between age and the manifestation. *Clin Inf Dis.* 2008;47:151-157.

Duah NO, Weiss HA, Jepson A, Tetteh KK, Whittle HC, Conway DJ. Heritability of antibody isotype and subclass responses to *Plasmodium falciparum* antigens. *PLoS One.* 2009 Oct 8;4(10):e7381. doi: 10.1371/journal.pone.0007381.

Elliott SR, Fowkes FJ, Richards JS, Reiling L, Drew DR, Beeson JG. Research priorities for the development and implementation of serological tools for malaria surveillance. *F1000Prime Rep.* 2014 Nov 4;6:100. doi: 10.12703/P6-100. eCollection 2014.

Escobar JE. Papel en la transmisión de malaria de las especies de *Kerteszia* en dos zonas endémicas de malaria en Colombia. Tesis del Doctorado Interfacultades en Salud Pública. Universidad Nacional de Colombia. 2012.

Esposito F, Lombardi S, Modiano D, Zavala F, Reeme J, Lamizana L, Coluzzi M, Nussenzweig RS. Prevalence and levels of antibodies to the circumsporozoite protein of

*Plasmodium falciparum* in an endemic area and their relationship to resistance to malaria infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1988;82:827–832

França CT, Hostetler JB, Sharma S, White MT, Lin E, Kiniboro B, Waltmann A, Darcy AW, Li Wai Suen CS, Siba P, King CL, Rayner JC, Fairhurst RM, Mueller I. An Antibody Screen of a *Plasmodium vivax* Antigen Library Identifies Novel Merozoite Proteins Associated with Clinical Protection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 May 16;10(5):e0004639. doi: 10.1371/journal.pntd.0004639.

Gray JC, Corran PH, Mangia E, Gaunt MW, Li Q, Tetteh KK, Polley SD, Conway DJ, Holder AA, Bacarese-Hamilton T, Riley EM, Crisanti A. Profiling the antibody immune response against blood stage malaria vaccine candidates. *Clin Chem.* 2007 Jul;53(7):1244-53. Epub 2007 May 17.

Greenwood BM. Asymptomatic malaria infections--do they matter? *Parasitol Today.* 1987 Jul;3(7):206-14.

Helb DA, Tetteh KK, Felgner PL, Skinner J, Hubbard A, Arinaitwe E, Mayanja-Kizza H, Ssewanyana I, Kanya MR, Beeson JG, Tappero J, Smith DL, Crompton PD, Rosenthal PJ, Dorsey G, Drakeley CJ, Greenhouse B. Novel serologic biomarkers provide accurate estimates of recent *Plasmodium falciparum* exposure for individuals and communities. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Aug 11;112(32):E4438-47. doi: 10.1073/pnas.1501705112.

Hostetler JB, Sharma S, Bartholdson SJ, Wright GJ, Fairhurst RM, Rayner JC. A Library of *Plasmodium vivax* Recombinant Merozoite Proteins Reveals New Vaccine Candidates and Protein-Protein Interactions. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015 Dec 23;9(12):e0004264. doi: 10.1371/journal.pntd.0004264.

Kano FS, Sanchez BA, Sousa TN, Tang ML, Saliba J, Oliveira FM, Nogueira PA, Gonçalves AQ, Fontes CJ, Soares IS, Brito CF, Rocha RS, Carvalho LH. *Plasmodium vivax* Duffy binding protein: baseline antibody responses and parasite polymorphisms in a well-consolidated settlement of the Amazon Region. *Trop Med Int Health.* 2012 Aug;17(8):989-1000. doi: 10.1111/j.1365-3156.2012.03016.x. Epub 2012 May 30.

King CL, Davies DH, Felgner P, Baum E, Jain A, Randall A, Tetteh K, Drakeley CJ, Greenhouse B. Biosignatures of Exposure/Transmission and Immunity. *Am J Trop Med Hyg.* 2015 Sep;93(3 Suppl):16-27. doi: 10.4269/ajtmh.15-0037;

Kleinbaum D.G., Klein M. Logistic Regression. *Statistics for Biology and Health.* 2010. Springer, New York, NY.

Mueller I, Galinski MR, Tsuboi T, Arevalo-Herrera M, Collins WE, King CL. Natural acquisition of immunity to *Plasmodium vivax*: epidemiological observations and potential targets. *Adv Parasitol.* 2013;81:77-131. doi: 10.1016/B978-0-12-407826-0.00003-5.

Osier FH, Mackinnon MJ, Crosnier C, Fegan G, Kamuyu G, Wanaguru M, Ogada E, McDade B, Rayner JC, Wright GJ, Marsh K. New antigens for a multicomponent blood-stage malaria vaccine. *Sci Transl Med.* 2014 Jul 30;6(247):247ra102. doi: 10.1126/scitranslmed.3008705.

Osorio L, Todd J, Bradley DJ. Travel histories as risk factors in the analysis of urban malaria in Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2004 Oct;71(4):380-6.

Phillips MA, Burrows JN, Manyando C, van Huijsduijnen RH, Van Voorhis WC, Wells TNC. Malaria. *Nat Rev Dis Primers.* 2017 Aug 3;3:17050. doi: 10.1038/nrdp.2017.50.

Ramasamy R, Nagendran K, Ramasamy MS. Antibodies to epitopes on merozoite and sporozoite surface antigens as serologic markers of malaria transmission: studies at a site in the dry zone of Sri Lanka. *Am J Trop Med Hyg.* 1994;50:537–547

Rosas-Aguirre A, Llanos-Cuentas A, Speybroeck N, Cook J, Contreras-Mancilla J, Soto V, Gamboa D, Pozo E, Ponce OJ, Pereira MO, Soares IS, Theisen M, D'Alessandro U, Erhart A. Assessing malaria transmission in a low endemicity area of north-western Peru. *Malar J.* 2013 Sep 22;12:339. doi: 10.1186/1475-2875-12-339.

Sousa T, Cera´volo I, Fontes CF, Couto A, Carvalho L & Brito C. The pattern of major polymorphisms in the Duffy binding protein ligand domain among *Plasmodium vivax* isolates from the Brazilian Amazon area. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 2006;146:251–254.

Souza-Silva FA, da Silva-Nunes M, Sanchez BA et al. Naturally acquired antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein (DBP) in Brazilian Amazon. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 2010;82:185–193.

Stanisic DI, Fowkes FJ, Koinari M, Javati S, Lin E, Kiniboro B, Richards JS, Robinson LJ, Schofield L, Kazura JW, King CL, Zimmerman P, Felger I, Siba PM, Mueller I, Beeson JG. Acquisition of antibodies against *Plasmodium falciparum* merozoites and malaria immunity in young children and the influence of age, force of infection, and magnitude of response. *Infect Immun.* 2015;83:646–660. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.02398-14>.

Steyerberg EW, Eijkemans MJC, Habemma DF: Stepwise selection in small data sets: A simulation study of bias in logistic regression analysis. *J Clin Epidemiol.* 1999;52(10)935-42.

Tom R, Bisson L, Durocher Y. Culture of HEK293-EBNA1 Cells for Production of Recombinant Proteins. *CSH Protoc.* 2008 Mar 1;2008:pdb.prot4976. doi: 10.1101/pdb.prot4976.

Ueno HM, Forattini OP, Kakitani I. Vertical and seasonal distribution of *Anopheles* (*Kerteszia*) in Ilha Comprida, Southeastern Brazil. *Rev Saude Publica*. 2007 Apr;41(2):269-75.

Vittor AY, Gilman RH, Tielsch J, Glass G, Shields T, Lozano WS, Pinedo-Cancino V, Patz JA. The effect of deforestation on the human-biting rate of *Anopheles darlingi*, the primary vector of *Falciparum* malaria in the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*. 2006 Jan;74(1):3-11.

Zenonos ZA, Rayner JC, Wright GJ. Towards a comprehensive *Plasmodium falciparum* merozoite cell surface and secreted recombinant protein library. *Malar J*. 2014 Mar 12;13:93. doi: 10.1186/1475-2875-13-93.

## 5. Discusión final

El presente trabajo se sustenta en tres pilares fundamentales: 1). Determinar la prevalencia de malaria asintomática en un contexto de transmisión urbana (Santa Mónica, Guapi) y otro de transmisión rural (El Cuerval, Timbiquí) en La Región Pacífica del departamento del Cauca; 2). Caracterizar el genotipo parasitario en cuanto a su perfil de marcadores moleculares de resistencia a los antimaláricos y caracterizar la estructura de la población de *P. falciparum* a partir de muestras de pacientes sintomáticos diagnosticados en puestos de la Red de Diagnóstico microscópico de malaria del municipio de Guapi, Cauca; 3). Determinar el perfil de exposición a la infección malárica a través de estudio serológico usando micromatrices (microarrays) de proteínas de *P. falciparum* y *P. vivax* a partir de sueros de individuos habitantes de una zona de transmisión urbana (Santa Mónica, Guapi) y otro de transmisión rural (El Cuerval, Timbiquí) en La Región Pacífica del departamento del Cauca.

Los resultados de la investigación permitieron caracterizar la dinámica de transmisión de la malaria en una región priorizada en las políticas nacionales y regionales de pre-eliminación y eliminación de la malaria. Actualmente en Colombia, los objetivos de la Estrategia de Gestión Integrada (EGI) para la promoción, prevención y control de las Enfermedades Transmitidas por Vectores en Colombia 2012 – 2021 y el Plan Decenal de Salud Pública en Colombia son los de reducir en 80% de manera progresiva y sostenida la mortalidad por malaria en todas las entidades territoriales durante el periodo 2012-2021, reducir progresivamente en 50% la morbilidad por malaria en las áreas endémicas del país hasta el año 2021 y, para el mismo año, eliminar la transmisión periurbana de malaria en los 16 focos identificados en Colombia, trece de los cuales están ubicados en la Región Pacífica colombiana. Una primera fase en las políticas de eliminación del país es identificar focos en departamentos de baja transmisión, específicamente en municipios con malaria periurbana, siendo Guapi, Cauca uno de los municipios seleccionados para

esta fase (Ministerio de Salud y Protección Social, 2013; Ministerio de Salud y Protección Social y OPS, 2014).

De acuerdo con las definiciones establecidas por la Organización Mundial de la Salud, el control de la malaria se entiende como “el descenso de la incidencia, la prevalencia, la morbilidad o la mortalidad de la enfermedad hasta un nivel localmente aceptable como consecuencia de actividades intencionadas. Se requieren intervenciones continuas para mantener el control” (OMS, 2017), es decir, es un estado en el cual las medidas de intervención reducen la malaria a niveles en los cuales no es un problema de salud pública, aunque la transmisión continúa en ausencia de casos importados (Cohen JM, et al., 2010). Por su parte, la eliminación se define como “la interrupción de la transmisión local (reducción de la incidencia de casos autóctonos a cero) de un determinado parásito palúdico en una zona geográfica definida, como consecuencia de actividades intencionadas. Se requieren medidas continuas para prevenir el restablecimiento de la transmisión” (OMS, 2017), es decir, se requiere de la capacidad y el compromiso de mantener las medidas de intervención de manera indefinida (Cohen JM, et al., 2010).

Una de la primeras medidas que sugieren las políticas mundiales de eliminación es la reorientación de los programas con el fin de realizar el proceso de transición de control a pre eliminación (OPS, 2011), pero en Colombia y particularmente en Guapi se necesita mucho más que esto.

Desde la perspectiva del Modelo Biomédico en Salud Pública, la triada clásica del proceso infeccioso que involucra al parásito, el ambiente (con las condiciones ecológicas propicias para el mantenimiento del vector) y el humano (Arredondo A, 1993), permite describir el contexto particular de la malaria en Guapi así:

Parásito:

- *P. falciparum* es la especie causante de más del 95% de los casos de malaria.
- En el presente estudio se identificó la presencia de una población de parásitos estructurada, en cuyo interior hay subpoblaciones discretas con alto grado de semejanza y con flujo genético entre ellas.
- Existe resistencia a los medicamentos antimaláricos identificada previamente en estudios de eficacia a los antimaláricos, con niveles de prevalencias bajas, comparadas con otras regiones del país. En el presente estudio se identificaron



mutaciones asociadas a resistencia a los antimaláricos, incluso en aquellos genes relacionados con una pobre respuesta clínica al tratamiento con derivados de artemisinina. Se identificó también un nuevo haplotipo asociado con resistencia a la cloroquina. Por otra parte, se identificó además la presencia de haplotipos silvestres en la mayoría de genes evaluados.

Ambiente:

- Las características ecológicas y los cambios epidemiológicos de la malaria en El Cuerval, obligan a la intervención urgente con medidas encaminadas a prevenir la aparición de nuevos brotes de malaria en este lugar.
- Evidente deterioro del medio ambiente a nivel urbano y rural muy relacionado con la presencia de asentamientos humanos desorganizados y carentes de planeación, producto en muchas oportunidades de desplazamiento forzado relacionado con el conflicto armado del país.
- Presencia de criaderos activos del vector transmisor de la malaria y de vectores transmisores de otras enfermedades. Hacen falta realizar estudios entomológicos que precisen el comportamiento vectorial de los anofelinos y su capacidad de transmisión.
- Coexistencia de otras enfermedades infecciosas, debido a las precarias condiciones de vida y a la falta de educación relacionada con la preservación el medio ambiente.
- Sistema de salud frágil y precario, además de desigualdad en la distribución y aplicación de las medidas encaminadas a prevenir la malaria. Existe falta de continuidad en las actividades de control de la malaria y ausencia de red de microscopistas para el diagnóstico de la enfermedad. Es evidente la desarticulación entre las actividades del programa ETV y las actividades de promoción y prevención a cargo de las EPS y las IPS del municipio.
- Es evidente la falta de presencia del Estado, acompañada de fragilidad institucional, altos niveles de corrupción en el ámbito público y un municipio declarado en quiebra.
- Ausencia de disposición adecuada de residuos sólidos.
- Falta de cobertura en servicios públicos básicos.
- Carencia de agua potable y sistema de alcantarillado.

- Desarrollo de la minería sin control que sumado a la presencia de asentamientos humanos desorganizados y carentes de planeación, generan un mayor deterioro del medio ambiente a nivel urbano y rural.
- Violencia asociada a problemas de orden público en zonas veredales e incluso la zona urbana. Presencia de grupos armados al margen de la ley posterior a la desmovilización de la guerrilla de las FARC.

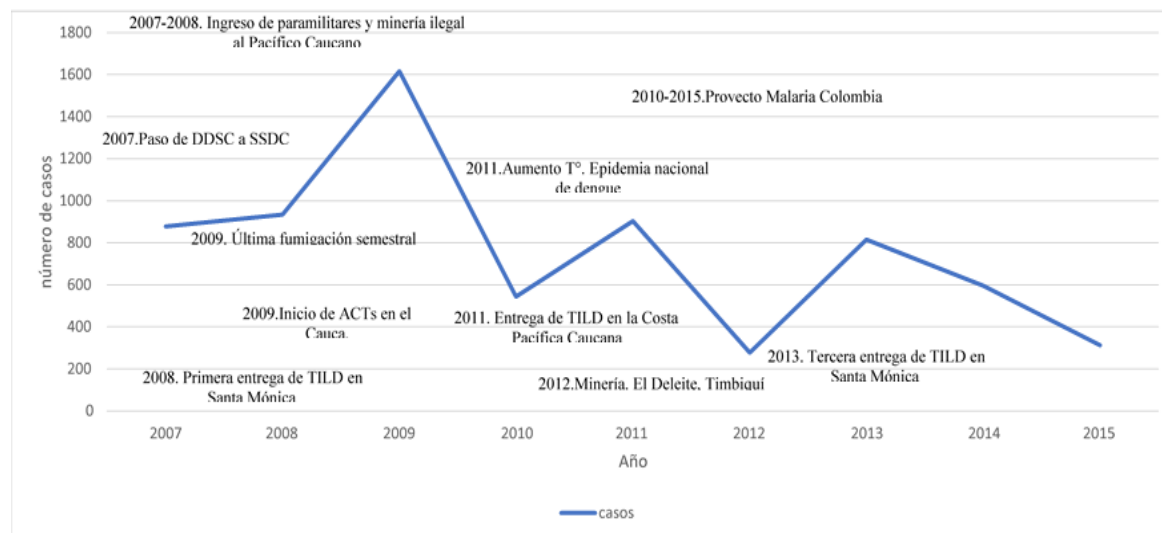
Humano:

- Infección malárica sintomática en aumento, similar al panorama nacional en los últimos dos años.
- El presente estudio identificó la presencia de infección malárica subclínica y asintomática microscópica y submicroscópica, es decir, presencia de reservorio humano de la infección que garantiza en buena medida el mantenimiento de la transmisión natural de la enfermedad.
- Como resultado del presente estudio se determinó que la exposición previa a la infección malárica está presente en más de la mitad de la población y se asocia con la edad, el tiempo viviendo en la residencia, la ocupación y el antecedente previo de malaria.
- La automedicación es una práctica identificada en los habitantes de la comunidad y esto es percibido por los funcionarios locales de salud: *“Compraban sus pastillas, se automedicaban si le daba fiebre con frío, entonces ellos compraban su medicamento, lo tomaban y cuando iban al médico era negativo”*.
- Altos niveles de pobreza y un sistema educativo frágil sin impacto en actividades relacionadas con el cuidado de la salud.
- Percepciones o creencias de los pobladores relacionadas con la enfermedad que podrían ser un obstáculo para la eliminación, pues las personas manifiestan que: *“nosotros nacimos con el paludismo”...“el paludismo se puede disminuir pero no eliminar”*.
- No hay adherencia total a las medidas de prevención de la malaria, como el uso de toldillos impregnados con insecticidas de larga duración, lo cual fue identificado al indagar por el uso de esta medida en la población de estudio.
- Alta movilidad humana que aumenta el riesgo de diseminación de parásitos resistentes a los medicamentos y de aparición de nuevos focos de malaria en lugares libres de ella.

- La comunidad está cansada de visitas e intervenciones sin resultados prácticos y evidentes.
- Riqueza cultural y de prácticas populares que contribuirían a mejorar la adherencia a las medidas de prevención y tratamiento. Existe un ámbito cultural rico en la transmisión oral del conocimiento, que debe ser pilar de apoyo en todas las medidas educativas de los programas de control y eliminación de la malaria.
- Presencia de organizaciones sociales, religiosas, grupos de jóvenes y artesanos, dispuestos a trabajar en pro de su comunidad.

De igual forma, es posible explicar la tendencia epidemiológica de la malaria asociada a momentos históricos relacionados con eventos que pueden incrementar o no la casuística. Al igual que ocurrió en el territorio nacional, en el período entre 2010 y 2015 se documentó una reducción paulatina de casos de malaria (Figura 5-1). Un evento que impactó de forma positiva y que contribuyó con la reducción de casos de malaria en la región fue el desarrollo del Proyecto Malaria Colombia, cuyos objetivos fueron: 1). Incrementar el acceso al diagnóstico oportuno y tratamiento adecuado; 2). Implementar la protección con toldillos impregnados con insecticidas de larga duración en la población vulnerable objeto de la intervención; 3). Implementar y sostener el subsistema de información y gestión inteligente para la toma de decisiones a través del fortalecimiento del nivel local; 4). Diseñar e implementar planes de comunicación y movilización social (COMBI) para incrementar factores protectores en malaria (Ministerio de Salud y Protección Social, Proyecto Malaria Colombia, 2015). Es importante resaltar que una de las medidas implementadas a nivel mundial y que más ha impactado en la reducción de casos de malaria fue el uso de toldillos impregnados con insecticidas de larga duración (Bhatt S, et al., 2015) y que en comunidades como Guapi, con una importante riqueza cultural, la movilización social y el uso de estrategias de comunicación efectivas encaminadas a potencializar la transmisión oral del conocimiento, se convierte en una herramienta de gran valor y utilidad para generar cambios en el comportamiento humano que limiten la exposición a la picadura del vector.

**Figura 5-1:** Tendencia del comportamiento epidemiológico de la malaria y su relación con eventos sociales, económicos, climáticos y administrativos del Programa para el Control de la Malaria. Cauca 2007-2015.



Fuente: Construcción propia.

TILD=Toldillos impregnados con insecticidas de larga duración. DDSC=Dirección departamental de salud del Cauca. SSDC=Secretaría de Salud Departamental del Cauca. ACTs= Terapia combinada basada en derivados de la artemisinina.

En la percepción de funcionarios de salud departamentales y locales del Cauca, el Proyecto Malaria Colombia contribuyó en gran medida a la reducción de casos de malaria, pero la falta de continuidad en las actividades y en el financiamiento posiblemente estén en relación directa con el aumento de casos evidenciado en el año 2016.

Es importante recordar que durante el año 2016 en el país se registró un aumento de 49% en el total de casos de malaria, con un aumento de 81% en los casos de malaria complicada con respecto al año 2015; en 2016 se registraron 36 casos mortales por esta enfermedad. De igual forma en el país, durante el período comprendido entre el año 2014 y el año 2017 el promedio de casos de infección por *P. falciparum* fue de 31037, con un rango entre 20067 y 47228, con una tendencia al incremento de casos desde el año 2014 y un pico máximo en el año 2016 (INS, 2014–2017). Durante los cuatro años de estudio, los casos de infección por *P. falciparum* en la costa pacífica caucana tuvieron un promedio de 1157, con un rango entre 313 y 1985, cuyo pico máximo fue en el año 2017 y el menor número de casos ocurrió en el año 2015. En Guapi, se presentaron en

promedio 389 casos de infección por *P. falciparum*, con un rango entre 134 y 520 y al igual que ocurrió en la costa pacífica caucana el pico de casos se observó en el año 2017 y el menor número de casos en 2015. En El Cuerval ocurrió un aumento de casi 10 veces en el número de casos de infección por *P. falciparum* en el año 2015 con respecto al año 2014, con una reducción paulatina posterior (Datos suministrados por la Secretaría Departamental de Salud del Cauca). Estos datos se presentan en la Tabla 5-1 al igual que los índices anuales de infección por *P. falciparum* (IFA). En el caso de Guapi, estos índices fueron construidos utilizando los datos del DANE del censo de 2005 con estimaciones para el año 2015, para lo cual se consideró como población de riesgo a la totalidad de la población rural (12076 habitantes) y 50% de la población urbana (8286). Como se observa, los índices parasitarios para los casos totales y por *P. falciparum*, clasifican a este municipio en una zona de riesgo medio y alto para la transmisión de malaria en el período entre 2014 y 2017, es decir, presenta índices parasitarios entre 1 y 10 y mayores a 10 respectivamente. En el caso de El Cuerval, se usó el censo obtenido por la Secretaría Departamental de Salud del Cauca que contabilizó 200 habitantes; los índices obtenidos clasifican a este lugar en riesgo alto para malaria durante el mismo período (2014-2017), por presenta índices parasitarios mayores a 10.

**Tabla 5-1:** Distribución de casos de infección por *P. falciparum* e IFA en Colombia, el Pacífico Caucaño, Guapi y El Cuerval. 2014 - 2017.

Año	Casos en Colombia	IFA	Casos en el pacífico caucano	IFA	Casos en Guapi	IFA	Casos en El Cuerval	IFA
2014	20067	1,89	596	1,3	413	20,3	6	30
2015	28951	2,7	313	0,7	134	6,6	56	280
2016	47228	4,5	1735	3,6	488	24	19	95
2017	27902	2,7	1985	2,8	520	25,5	2	10

Fuente: Construcción propia (INS, 2014–2017).

En la actualidad en Colombia, la Estrategia de Gestión Integrada (EGI) para la promoción, prevención y control de las Enfermedades Transmitidas por Vectores 2012–2021 y el Plan Nacional de Salud Pública 2012-2021 tienen como objetivos reducir en 80% la mortalidad y en 50% la morbilidad por malaria y eliminar la transmisión periurbana en los focos identificados, la mayoría en la Región Pacífica (Ministerio de Salud y Protección Social, 2013; Ministerio de Salud y Protección Social. OPS, 2014).

La EGI está conformada por siete componentes: 1) gerencia del programa (planeación monitoreo y evaluación); 2) inteligencia epidemiológica (notificación semanal de casos y muertes); 3) gestión del conocimiento (reentrenamiento de los funcionarios); 4) promoción de la salud (participación comunitaria) 5) prevención primaria de la transmisión (reducción de la exposición al vector, control de criaderos, uso de larvicidas, rociado residual intradomiciliario y uso de toldillos impregnados con insecticidas de larga duración (TILD)); 6) atención integral de pacientes (diagnóstico, tratamiento y búsquedas activas); y 7) gestión de y atención de contingencias (respuesta oportuna a brotes) (Ministerio de Salud y Protección Social y OPS, 2014).

Partiendo de los componentes de la EGI y de acuerdo con la Ley 1438 de 2011, las nuevas políticas de eliminación de la malaria en Colombia deben concebir un abordaje integrado desde la Atención Primaria en Salud, de tal forma que los pobladores deben hacer parte fundamental en el diseño de estrategias y la formulación de los planes operativos debe contar con la participación de líderes comunitarios asegurando equidad, inclusión e intersectorialidad (Ley 1438 de 2011).

Adicionalmente, la Política de Atención Integral en Salud tiene como objetivo mejorar las condiciones de salud de los colombianos asegurando el “acceso a los servicios de salud de manera oportuna, eficaz y con calidad para la preservación, el mejoramiento y la promoción de la salud”, como se establece en la Ley Estatutaria 1751 de 2015. Esta Política de Atención Integral en Salud requiere un modelo operativo definido a partir de un grupo de estrategias establecidas; este modelo se conoce con el nombre de Modelo Integral de Atención en Salud (MIAS), el cual prioriza el bienestar del individuo, con intervenciones dirigidas a la promoción de la salud, cuidado, protección específica, detección temprana, tratamiento, rehabilitación y paliación a lo largo del curso de la vida, con oportunidad, pertinencia, accesibilidad, eficiencia, eficacia y efectividad. Para desarrollar el MIAS se requiere organizar a la población en grupos de riesgo y las actividades deben estar en concordancia con las metas propuestas en el Plan Nacional de Salud Pública 2012-2021. La malaria se encuentra ubicada en el grupo de población con riesgo de presentar la enfermedad o con manifestaciones de la misma y comparte el grupo con otras enfermedades transmitidas por vectores. A cada grupo de riesgo se le definen Rutas Integrales de Atención en Salud (RIAS), que incluyen cuatro componentes: 1) Gestión de la Salud Pública, 2) Promoción de la salud, 3) Acciones en los entornos y 4) Acciones individuales (Ministerio de Salud y Protección Social, 2016). Es decir, la

Política de Atención Integral en Salud va de la mano con lo establecido en la EGI, el Plan Nacional de Salud Pública 2012-2021, la Atención Primaria en Salud, todo en el marco de la Ley Estatutaria de Salud de 2015.

El municipio de Guapi está priorizado en las políticas nacionales para la eliminación de la malaria, debido a la presencia de transmisión urbana y a la alta carga de esta enfermedad, lo cual se ve reflejado en los índices parasitarios anuales que lo clasifican en una zona de riesgo medio y alto para malaria, como se explicó anteriormente (Programa Nacional para PyP ETV, 2017). Como se describió previamente, sus habitantes enfrentan condiciones de exclusión y pobreza extrema, además de registrar los peores indicadores en salud en cuanto acceso al servicio e índices elevados de morbilidad y mortalidad por enfermedad general en todos los grupos de edad, siendo Guapi el segundo municipio más pobre de la región. La encuesta de calidad de vida del DANE del año 2011 informó que 97,55% de sus habitantes estaba con necesidades básicas insatisfechas (NBI), y de éstos, 29,3% se encontraba en situación de miseria (DANE, 2012). Timbiquí y Guapi aportaron entre 40% y 95% de los casos de malaria por año en el departamento del Cauca en el periodo comprendido entre 2012 y 2016 (SSDC, 2017).

Para algunos autores, el diseño de políticas de eliminación de las enfermedades infecciosas debe enfrentar los diferentes escenarios culturales de los pobladores que las padecen y es necesario ajustar los contenidos y procesos de las estrategias durante la implementación de los programas (Whittaker MA, et al., 2014).

Al entrevistar a un grupo de mujeres habitantes permanentes de Guapi, funcionarias del sistema de salud y algunas de ellas exfuncionarias del antiguo Servicio de Erradicación de la Malaria (SEM), ellas hacen énfasis en que las principales estrategias que contribuirían a la eliminación de la malaria en Guapi son: 1) fortalecer las actividades institucionales propias del programa para el control de las Enfermedades Transmitidas por Vectores, como la distribución de toldillos, uso de rociado residual intradomiciliario, diagnóstico adecuado y tratamiento oportuno de la malaria; 2) implementar las búsquedas activas de casos de malaria con énfasis en zonas rurales; 3) asegurar la contratación del personal encargado de diagnóstico y tratamiento de malaria tanto en zona rural como en zona urbana; 4) implementar un sistema de educación continua del personal de salud; 5) generar estrategias de empoderamiento de la comunidad a través

de la educación y 6) promover el desarrollo de proyectos de carácter interinstitucional. Evidentemente estos puntos están estrechamente relacionados con los componentes de la EGI descritos anteriormente y hacen parte del sentir y la percepción de los pobladores de Guapi.

De igual forma, estas mujeres expresan que los principales obstáculos que impedirían un adecuado proceso de eliminación de la malaria en Guapi son: 1) dificultades en el acceso al servicio de salud a nivel rural y urbano; 2) condiciones ambientales relacionadas con fenómenos naturales (inundaciones por el efecto de las mareas), la minería y la fragilidad de la infraestructura del municipio que favorecen la presencia del criaderos del vector; 3) fallas en el suministro de toldillos y en la contratación del personal encargado del diagnóstico y tratamiento de la malaria y 4) automedicación de la población frente a síntomas relacionados con la malaria y falta de adherencia de los habitantes a las estrategias de prevención, como el uso de toldillos impregnados con insecticidas de larga duración.

Es importante resaltar que desde la percepción de los habitantes de Guapi, la malaria ha ido en aumento en los últimos años, hecho asociado con actividades económicas re-emergentes en la región como la minería, lo cual es expresado por sus pobladores de manera muy puntual y específica: *“Desde 2013 en San José de Guare (Guapi) hay retroexcavadora (...para la explotación minera) y esto ha aumentado el paludismo”*.

Históricamente, la malaria y la actividad minera tienen una estrecha relación, siendo esta documentada en diferentes estudios conducidos en África, Asia y América (Asante KP, et al., 2011; Soe HZ, et al., 2017; Sanchez JF, et al., 2017). Dichos estudios explican que el aumento en la transmisión de la malaria está relacionado con la creación de nuevos criaderos artificiales del vector, la introducción de nuevos genotipos del parásito producto de la migración de mineros procedentes de otras regiones y, relacionado con este último aspecto, el ingreso de personas susceptibles como producto de la movilidad humana asociada con las necesidades económicas. De igual forma, en muchas de estas regiones también se ha evidenciado el cambio de hábitos del vector, favoreciendo su comportamiento antropofílico. El efecto de la asociación entre la minería del oro y la malaria se ha podido cuantificar y de acuerdo con cálculos realizados en estudios previos en Brasil, se estimó que por cada 100 kg de oro producidos, el índice parasitario anual (IPA) aumentó en 0,37/1000 habitantes y las tasas de incidencia anuales aumentaron



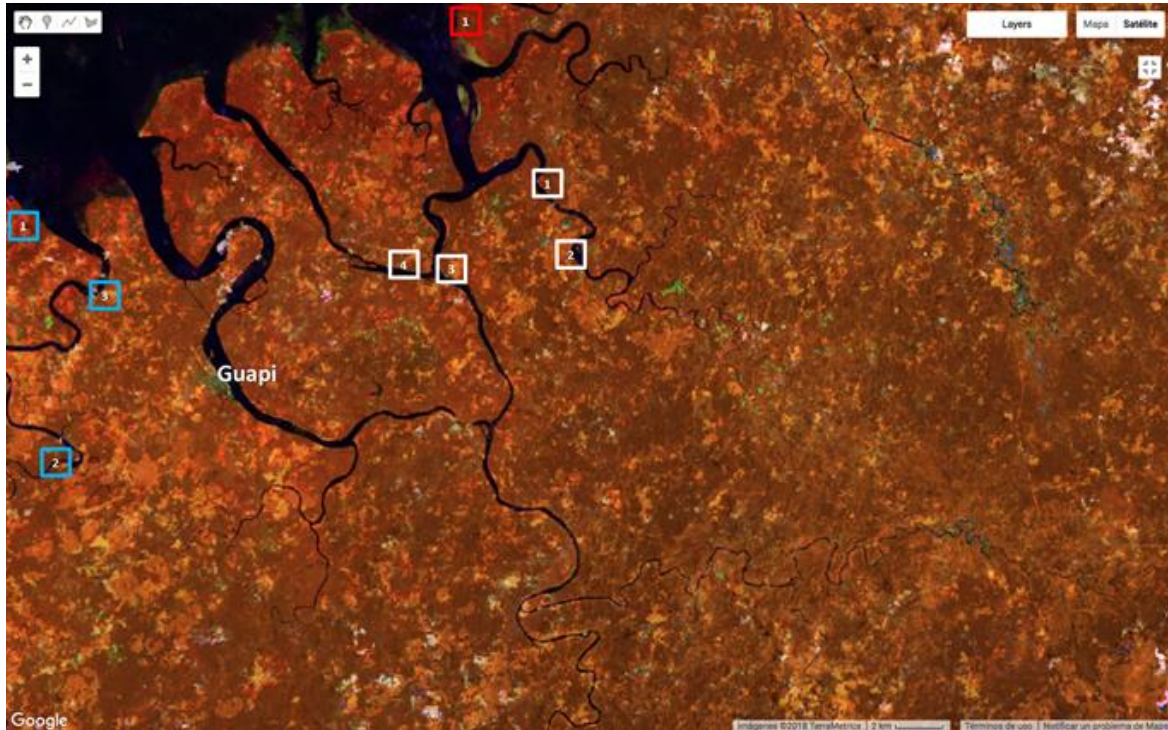
entre 160 y 260 casos/1000 habitantes (Duarte EC & Fontes CJ, 2002). En Colombia, por cada 100 kg de oro producidos, el IPA se incrementó en 0,54 casos por 1000 habitantes (Castellanos A, et al., 2016).

Específicamente en Colombia, la minería es considerada un renglón económico de gran importancia en diferentes regiones del país y muchas de estas regiones presentan altos porcentajes de necesidades básicas insatisfechas, elevados índices de pobreza y fragilidad institucional con escasa presencia del Estado (Castellanos A, et al., 2016). La minería del oro en Colombia puede ser producto de la explotación legal e ilegal (PwC, 2012; Güiza L & Aristizabal JD, 2013) y aunque ambos escenarios contribuyen con el aumento en la exposición a la malaria, se cree que la explotación ilegal genera más daños medioambientales con los consecuentes efectos en la transmisión malárica (Castellanos A, et al., 2016).

En Colombia, durante el periodo comprendido entre 2010 y 2013, 89,3% de los casos de malaria (270753 casos) procedieron de localidades pertenecientes a los departamentos de Antioquia, Córdoba, Bolívar, Chocó, Nariño, Cauca y Valle y en este mismo periodo de tiempo 31,6% de los casos procedieron de zonas mineras en estas regiones (Castellanos A, et al., 2016). Durante el año 2016, el departamento del Chocó, en el cual se encuentran los más importantes centros de minería de oro a cielo abierto en el país, presentó un aumento inusitado de casos y muertes por malaria en Colombia, considerado como uno de los peores momentos para la historia de la malaria en los últimos años en el país y en la Región de las Américas (OMS, OPS, 2017). Un estudio llevado a cabo por el Observatorio Nacional de Salud del Instituto Nacional de Salud de Colombia encontró que los municipios en el departamento del Chocó con mayor producción de oro también presentan en promedio el mayor número de casos de malaria anualmente durante el periodo 2007 a 2014 (Chocontá LA & Díaz DP, 2017).

Con el fin de explicar mejor la percepción de los habitantes de Guapi con respecto a la asociación entre la minería y la malaria en la región, en la Figura 5-2 se presentan las diferentes formas de intervención humana al ecosistema (minería, explotación maderera, entre otras) en relación con las cuencas hidrográficas y las localidades informadas como las más frecuentes procedencias de los casos de malaria en la Región de Guapi en el presente estudio.

**Figura 5-2:** Distribución de las intervenciones al medio ambiente por la minería u otras actividades humanas y la ubicación geográfica de las localidades con mayor número de casos de malaria reportados. Región Guapi-Cauca. 2014-2017.



Fuente: Google Engine. Alejandro Feged Rivadeneira (Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia).

En puntos verdes se señala las zonas con intervenciones en el medio ambiente por la minería u otras actividades humanas. En cuadro rojo se señala la localidad perteneciente al municipio de Timbiquí. 1 = El Cuerval. En cuadros blancos se señalan las localidades pertenecientes al municipio de Guapi. 1 = El Carmelo. 2 = San José de Guare. 3 = Limones. 4 = Quiroga. En cuadros azules se señalan las localidades pertenecientes al departamento de Nariño. 1 = Chico Pérez. 2 = Chanzará. 3 = Bagrero.

Por otra parte, con el fin de explicar la situación administrativa del programa para el control de la malaria y que en parte refleja el sentir de los pobladores de Guapi, principalmente con respecto a los obstáculos para la eliminación de la malaria, es necesario conocer los antecedentes. Con la Ley 100 y la Ley 60 de 1993 el Sistema de Salud colombiano sufrió un cambio drástico y los programas centralizados y verticales, como el de malaria, se desarticularon y casi que desaparecen. En esa época las funciones del programa de control de la malaria pasaron a ser responsabilidad de los municipios y los departamentos (Borrero E, et al., 2012). A partir 1997, el diagnóstico y tratamiento de la malaria se incluyeron en los planes de beneficio como acciones individuales, de tal forma que las actuales empresas aseguradoras deben garantizar a los

afiliados estas acciones individuales, incluidas en el Plan Obligatorio de Salud (POS). Las acciones colectivas, es decir, las actividades de promoción, prevención, vigilancia y control de la malaria y otras enfermedades transmitidas por vectores forman parte del Plan de Atención Básica (PAB), el cual está a cargo de los municipios, quienes lo deben ofrecer en forma gratuita a toda la población de forma directa o a través de contratos (Arroyave A, 1999). En el marco del Sistema de Seguridad Social en Salud (SGSSS), las actividades colectivas están a cargo del Estado, lo cual se encuentra consignado en la Ley 715 de 2001 (Ley 715 de 2001), está reglamentado en la Resolución 425 de 2008 y la financiación está establecida en la misma Resolución (Resolución 425 de 2008). Las actividades individuales están a cargo de las aseguradoras (Empresas promotoras de salud-EPS) y las instituciones prestadoras de servicios de salud (IPS), como se establece en el Acuerdo 117 de 1998 (Acuerdo 117 de 1998). Es decir, de acuerdo con lo consignado en la ley y en el marco legal del actual sistema de salud, existe la disponibilidad del recurso financiero para atender la demanda individual y colectiva, con el fin de asegurar todas las actividades encaminadas al diagnóstico oportuno y tratamiento adecuado de los casos por malaria, además de las actividades dirigidas al control vectorial y la prevención de la transmisión vectorial. Sin embargo, en la práctica del escenario de Guapi en particular, se observan graves problemas en el ofrecimiento del servicio de diagnóstico y tratamiento de la malaria, además del abastecimiento irregular de material, suministros y medicamentos destinados a dicho servicio. Esta situación puede deberse a los efectos negativos de la reforma sanitaria, los cuales incluyen el fraccionamiento de las acciones, la desarticulación de la gestión y la búsqueda de utilidades económicas del modelo de salud, lo cual evidentemente entorpece el desarrollo de las actividades individuales y colectivas del programa (Jiménez MM, et al., 2007).

Particularmente en el Departamento del Cauca, con la liquidación de la Dirección Departamental de Salud se perdió la trayectoria y experiencia de un buen número de funcionarios que pertenecían al antiguo SEM y que habían ingresado a la Dirección Departamental desde el año 1996, pues en la nueva Secretaría de Salud Departamental, creada en 2007, solo se tuvieron en cuenta a 2 funcionarios del antiguo SEM.

En Guapi, las actividades de diagnóstico y tratamiento de la malaria se desarrollan por la red de microscopistas que funciona en zona urbana y rural del municipio, la cual es contratada por la Secretaría Departamental de Salud. Estas actividades también son

prestadas por las diferentes IPS de la zona urbana y la ESE. Es necesario aclarar que en el municipio operan las siguientes EPS en el POS contributivo: Coomeva, Saludcoop, Nueva EPS y SOS (Servicio Occidental de Salud) y Asmetsalud, SaludVida y AIC (Asociación Indígena del Cauca) en el POS subsidiado. Estas entidades reciben una unidad de pago por captación, dinero que debe ser destinado para financiar las actividades para la atención de enfermedades de interés en Salud Pública, como la malaria y que son de obligatorio cumplimiento de acuerdo con lo consignado en el Acuerdo 117 de 1998 tanto para el POS contributivo como el subsidiado, como se explicó anteriormente. Guapi es clasificado por el Departamento Nacional de Planeación como un municipio con bajos Ingresos Corrientes de Libre Destinación (ICLD), lo cual obliga a que las actividades colectivas sean competencia del ente territorial departamental.

La falta de continuidad en la contratación de la red de microscopistas y el desabastecimiento de insumos y medicamentos, aspectos que conducen a la falta de diagnóstico oportuno en la región, fue uno de los graves problemas administrativos identificados. El desarrollo del presente trabajo se facilitó gracias a la financiación del proyecto titulado “Herramientas, formación y redes encaminadas a reducir la carga por la malaria en Colombia”, por parte del Fondo Newton-Caldas del Consejo Británico, lo cual aseguró la contratación temporal de tres microscopistas pertenecientes a la red, entre los años 2015 y 2017, periodo durante el cual la contratación del personal encargado del diagnóstico y tratamiento de la malaria en la región fue muy irregular. Dentro de los lineamientos a nivel nacional y desde 1995 el Instituto Nacional de Salud (INS) incluyó el programa de malaria dentro de la Red Nacional de Laboratorios, el cual tiene como actividades la capacitación y evaluación del desempeño de los microscopistas encargados del diagnóstico y tratamiento de la malaria en las zonas urbanas y rurales de los municipios en los cuales esta enfermedad es endémica (Ospina OL, et al., 2012) y dichas actividades se desarrollan con la participación de los laboratorios departamentales de salud pública. Particularmente para Guapi, estas actividades requieren de un fortalecimiento que garantice la supervisión, capacitación, evaluación externa directa e indirecta y calificación del desempeño de los microscopistas por parte del laboratorio departamental de salud pública del Cauca, con asesoría del INS (Ospina OL, et al., 2012). Como Guapi no es un municipio autónomo debido a su fragilidad económica relacionada con la declaración de quiebra bajo la ley 550 de 1990 (Ley de insolvencia económica) (Ley 550), está dentro de los 60 municipios peor calificados dentro de la

clasificación del Departamento Nacional de Planeación, de acuerdo con su capacidad burocrática y la eficacia y eficiencia en la producción de resultados referidos a sus planes de desarrollo y tiene altos índices de corrupción administrativa (Unidad Nacional para la Gestión del Riesgo de Desastres, 2015), este municipio requiere del apoyo técnico de manera permanente de las entidades a nivel nacional y departamental en relación con el desarrollo de las actividades propias de la red de microscopistas. Este grave vacío administrativo hace que actividades como la búsqueda activa de portadores asintomáticos, desarrollada en el presente trabajo, y el diagnóstico rutinario básico de malaria se vean gravemente comprometidos con la consecuente dificultad en la implementación de las estrategias de pre-eliminación y eliminación. Si se logra estructurar una red de diagnóstico robusta, se podría en el futuro pensar en la implementación de pruebas de diagnóstico molecular que mejorarían de forma ostensible la sensibilidad del diagnóstico. Además, es importante recordar que como parte de los cambios necesarios para reorientar los programas del control hacia la eliminación, se debe contar con un “sistema de gestión de calidad del diagnóstico completamente funcional” y “fortalecer la red de microscopía para garantizar el acceso oportuno al diagnóstico parasitológico del 100% de los casos” (OPS, 2011).

Como se expone, existe suficiente recurso financiero y un robusto marco legal para asegurar el adecuado diagnóstico y tratamiento de la malaria en Guapi, pero se debe mantener la contratación permanente de la red de microscopistas y asegurar la adecuada atención del servicio en el hospital, la cual también es deficiente. Es importante determinar cuáles son las fallas en el municipio y el departamento para el adecuado cumplimiento de la ley y la reglamentación establecidas.

Un hallazgo importante del presente trabajo fue el diagnóstico de portadores subclínicos y asintomáticos microscópicos y sub-microscópicos de la malaria tanto a nivel urbano como a nivel rural. El concepto de malaria asintomática fue nuevo, tanto para la población general como para los funcionarios del programa. En la percepción de una microscopista encargada del diagnóstico en Guapi, incidir en este factor facilitaría el proceso de eliminación: *“Si se identifica la malaria asintomática, tal vez por ahí se acabaría el paludismo”*. Lo anterior refuerza la necesidad de combinar la educación y apropiación de conceptos relacionados con la malaria, teniendo en cuenta el ámbito socio-cultural, con aquellas actividades probadas en la reducción de casos como el control vectorial, el uso de toldillos impregnados con insecticidas de larga duración y el

diagnóstico y tratamiento oportuno con derivados de la artemisinina (Phillips MA, et al., 2017). Es necesario articular todas las estrategias de control y eliminación con la gran riqueza cultural y de saberes populares de la región, con el objetivo de mejorar la adherencia de la población a estas medidas. Guapi es uno de los municipios del Pacífico Colombiano que cuenta con mayor número de organizaciones no gubernamentales, grupos de mujeres y jóvenes y grupos religiosos que aportan al mejoramiento de las condiciones de vida y de salud de los pobladores (Unidad Nacional para la Gestión del Riesgo de Desastres, 2015), situación que las instituciones gubernamentales podrían aprovechar para generar redes de apoyo hacia la eliminación de la malaria.

Es indiscutible que la principal recomendación que se desprende del presente estudio es realizar el monitoreo continuo del diagnóstico de la malaria asintomática, con el fin de tratar a aquellos individuos que se comportan como reservorios de la infección y que perpetúan la transmisión de la malaria. Sin embargo, y como se ha mencionado anteriormente, también es indiscutible la necesidad de asegurar las condiciones básicas de diagnóstico y tratamiento de la enfermedad, a través de la consolidación de una red de microscopistas estable y que asegure la vigilancia de la malaria asintomática y por supuesto, la malaria sintomática y que realice la notificación, por lo menos semanal, de estos eventos. La red de microscopistas en esta región requiere de un funcionamiento dinámico, con una central operativa de trabajo ubicada en el puesto de diagnóstico de la zona urbana de Guapi, acompañado de puestos secundarios en zonas críticas como El Cuerval, Limones, Carmelo, Quiroga y Chanzará, o en aquellas zonas en las cuales se evidencien situaciones de riesgo tales como nuevos centros de explotación minera. El término dinámico se refiere a que el funcionamiento de cada puesto dependerá de la vigilancia semanal del evento malaria, lo cual permitirá fortalecer estrategias de control, que incluye entre otras actividades, la búsquedas activas de casos en población susceptible recientemente establecida en la zona, control de nuevos o reconocidos criaderos del vector producto de la actividad minera o de asentamientos humanos no planificados y fortalecer las estrategias dirigidas a conseguir cambios en el comportamiento de los habitantes enfocados a usar adecuadamente los toldillos impregnados con insecticidas de larga duración, principalmente en zonas mineras. Dichas actividades no pueden ser producto solo de un cronograma fijo mes a mes, sino que se requiere de la evaluación periódica y de ajustes que van a depender de la identificación de factores riesgo, el aumento o disminución de casos y del

acompañamiento permanente de la comunidad en trabajo comunitario dirigido a disminuir la exposición a la picadura del vector.

Previo al uso de derivados de la artemisinina, la situación de resistencia de *P. falciparum* a los antimaláricos en la Región Pacífica se caracterizó por niveles de fracaso superiores al 40% a la cloroquina como monoterapia, siendo los más altos del país, y a la sulfadoxina-pirimetamina, también como monoterapia, entre 3 y 20%. La combinación sulfadoxina pirimetamina más amodiaquina tiene reportes de falla entre 0 y 2%; es decir, antes de la implementación de la terapia combinada con derivados de la artemisinina se tenían buenos niveles de respuesta terapéutica a la terapia combinada con otros medicamentos, pero las políticas nacionales y mundiales obligaron su suspensión (Blair S, et al., 2006; Méndez F, et al., 2002). Como se analizó en el presente estudio, aunque 4 de 24 posiciones en los genes evaluados exhibieron el haplotipo silvestre y en 15 de 24 las frecuencias del haplotipo silvestre fueron superiores al 50%, se identificó una nueva mutación asociada con resistencia a la cloroquina (CVIDT en el gen *pfcr1*), además de la mutación asociada con el retraso en la eliminación de la masa parasitaria con derivados de artemisinina (genotipo VDDNI del grupo de genes PBG-mutación en el gen *pfmdr2*-) e incluso una mutación relacionada con antimaláricos que no hacen parte de los esquemas nacionales para el tratamiento de la malaria no complicada por *P. falciparum* como la piperquina y el proguanil (S108T en el gen *pfdhfr*). Estos hallazgos indican que se requiere el monitoreo permanente del perfil de marcadores moleculares de resistencia a los antimaláricos y de ser posible, el seguimiento clínico y parasitológico al día tres del tratamiento con derivados de la artemisinina. Los posibles factores que estarían asociados con estos hallazgos tienen que ver con la movilidad humana y la presión de selección de medicamentos para el tratamiento de la malaria u otras patologías infecciosas, como el caso de los antifolatos. Es necesario mejorar la calidad y el acceso al servicio de salud, pues la automedicación, factor asociado con la aparición de resistencia a los antimaláricos, se evidencia en la población como lo expresa una microscopista de la red: “Ir al hospital es perder el tiempo, allí no le hacen exámenes y si no tiene fiebre, no lo atienden entonces se automedican”.

Como se presentó en el aparte del presente documento “Características genotípicas y la estructura de población de los parásitos causantes de malaria sintomática en Guapi-Cauca, Colombia”, el área de influencia de los puestos de diagnóstico de la red de microscopistas, particularmente Guapi en el casco urbano presenta zonas que abarcan

localidades rurales de Guapi, Timbiquí y el departamento de Nariño. Las localidades con mayores frecuencias de procedencia de casos fueron Carmelo, San José de Guaré, Quiroga, Limones y El Carmen en zona rural de Guapi; El Cuerval y Playa Chacón en zona rural de Timbiquí; Bagrero, Chanzará y Chico Pérez en zona rural de Nariño. Estos eventos confirman la alta movilidad de la población en el sector y la necesidad de caracterizar adecuadamente los focos y delimitar las áreas maláricas como parte de los cambios requeridos en los programas de control para reorientar las acciones hacia la eliminación de la malaria (OPS, 2011), además del establecimiento de puestos de diagnóstico y tratamiento dinámicos como se explicó anteriormente.

El hallazgo de coeficientes de diferenciación genética de *P. falciparum* entre 0,39 y 0,84, con al menos 3 subpoblaciones con diferentes ancestros genéticos puros o mezclados entre sí, se traduce en baja diversidad genética regional de las poblaciones del parásito y también indica que no existe una única población de parásitos, lo cual implica que se presenta intercambio genético entre las subpoblaciones. Es importante resaltar que los cambios en la estructura de población del parásito están en estrecha relación con los desplazamientos humanos, la movilidad del mosquito o las intervenciones para el control de la malaria, por lo tanto, su monitoreo es clave en el marco de los programas de pre-eliminación y eliminación de esta enfermedad.

La respuesta serológica como medida indirecta de la intensidad de transmisión de la malaria y el análisis multivariable, permitieron identificar exposición previa a la infección por *P. falciparum* en más de 50% de la población evaluada, asociada con las variables de edad, tiempo viviendo en la residencia, ocupación y antecedente previo de malaria. La asociación identificada entre la seropositividad a *P. falciparum* con el tiempo viviendo en la residencia mayor a 10 años y el antecedente de haber sufrido de malaria, indican que existe una población previamente expuesta, que ha desarrollado respuesta inmune frente a la infección y que su desarrollo depende de la edad. Además, es posible concluir que la exposición a la malaria tiene que ver con las edades económicamente productivas y está en estrecha relación con las actividades laborales que incrementan la exposición al vector, como la minería, la pesca y la agricultura; tales resultados refuerzan la necesidad del uso de medidas preventivas como el uso de toldillos impregnados con insecticidas de larga duración. La adherencia a esta medida es bastante difícil en la región, como lo expresa una microscopista encargada del diagnóstico en Guapi: “*La gente trabaja en la montaña, no se previene de usar toldillo y de allá viene con paludismo; los mineros traen*



de la mina el paludismo”; “...hay personas que saben qué el toldillo sirve para eso y no les gusta dormir con toldillo y no lo utilizan”. Se debe trabajar intensamente en la aceptación cultural de las estrategias encaminadas a la eliminación de la malaria. Por otra parte, se debe determinar el comportamiento vectorial, pues es posible que la transmisión se realice en el extra y peridomicilio, lo cual obligaría a proponer otro tipo de estrategia que disminuya el contacto vector-humano, como el uso de repelentes personales (Escobar JE, 2012).

Es necesario enfatizar en la necesidad de mejorar el conocimiento relacionado con biomarcadores de exposición a las diferentes especies de *Plasmodium* que permitan caracterizar portadores de infección asintomática y que contribuyan a la serovigilancia en escenarios orientados al control y la eliminación de la malaria. Los resultados del presente estudio ofrecen datos iniciales en la búsqueda de estos biomarcadores de exposición a la infección por *P. falciparum* y *P. vivax* en Colombia.

Con el panorama biológico, social y administrativo presentado, es importante seguir invirtiendo recurso humano y técnico en la obtención de resultados para análisis académicos que apoyen y den solución a una realidad que salta a la vista. Guapi carece de intervención del Estado en muchos aspectos y las Universidades Públicas, representantes del Estado Colombiano, como la Universidad Nacional están en la obligación de poner sus servicios a disposición de las necesidades de la población; por ejemplo, ofrecer educación continuada al personal médico del Hospital a través de algún tipo de convenio interinstitucional y de igual forma, las facultades de ingeniería tienen el campo para participar en el diseño o mejora de la red de acueducto y alcantarillado y la construcción de un lugar para la disposición de residuos sólidos. Claramente en el proceso habrá obstáculos administrativos por resolver, pero la Universidad cuenta con las herramientas para orientar muchos procesos que resuelvan de forma práctica la problemática de este lugar. La finalidad no es ir contra la financiación de investigaciones básicas o en salud pública, ni se trata de restar la responsabilidad a las instituciones gubernamentales en la mejora de la infraestructura del municipio y asumir las funciones que les corresponden por ley, ni tampoco escudarse en los altos índices de corrupción de muchos lugares en la Región Pacífica colombiana, pero tampoco se puede dar la espalda a la precaria condición de vida de los guapireños, identificada en muchos momentos del presente trabajo.

## **5.1 Propuesta para el abordaje del problema: Unidad de Control de la Región Guapi**

Los casos de malaria de la región de Guapi, Timbiquí y Nariño fueron informados en 26 localidades y de estos, 64,7% de los 207 casos proceden de 9 localidades rurales en la región; 4 en Guapi (El Carmelo, San José de Guare, Limones y Quiroga), 2 en Timbiquí (El Cuerval y Playa Chacón) y 3 en Nariño (Chico Pérez, Chanzará y Bagrero). La distancia promedio de estas 9 localidades al casco urbano de Guapi es de 14,3 Km. Los desplazamientos se realizan en general por vía fluvial y marítima y solo uno de ellos, la vía Chanzará a Guapi, se puede hacer por vía terrestre en medio de trochas. Los casos reportados de procedencia urbana del municipio de Guapi correspondieron a 14,5% (30/207). La distribución de los casos y las distancias a la zona urbana de Guapi se presentan en la Tabla 5-2 y su ubicación geográfica se señala en la Figura 5-3. En un eventual proceso de eliminación de la malaria en la región, la unidad de control-eliminación debe incluir el casco urbano del municipio de Guapi y estas 9 localidades rurales, dada el área de influencia identificada para el puesto de diagnóstico ubicado en zona urbana de este municipio. En la Tabla 5-2 también se describe la distribución de casos de malaria por año, evidenciando un importante aumento de casos entre 2016 y 2017, lo cual está en relación con el pico epidémico reportado en la zona durante ese periodo.

En esta zona geográfica existen otros tres puestos de diagnóstico de malaria adicionales al de la zona urbana de Guapi (El Carmelo, Chanzará y El Cuerval) y pertenecientes a la Red de Microscopistas del Cauca, los cuales funcionan de manera muy irregular debido a las dificultades en la contratación del personal, lo que obliga a los habitantes a desplazarse a la zona urbana de Guapi para recibir el diagnóstico y tratamiento en caso de presentar malaria, ya sea en el puesto de diagnóstico de la zona urbana del municipio cuando hay microscopista contratado o en el Hospital (ESE de Guapi). Por esto se necesita fortalecer los puestos de la Red de Microscopistas en la región con el fin de asegurar el acceso oportuno al diagnóstico y tratamiento de la malaria.

**Tabla 5-2:** Distribución de los 207 casos positivos para malaria por localidad y año y la distancia con respecto a la zona urbana de Guapi. Región Guapi-Cauca. 2014-2017.

Localidad	Número de casos	Porcentaje (n=207)	Distancia a zona urbana de Guapi (Km)	Año				
				2014	2015	2016	2017	ND
<b>Guapi</b>								
Zona urbana <sup>α</sup>	30	14,5	NA	1	9	0	17	3
El Carmelo	51	24,6	15,8	0	0	1	49	1
San José de Guare	20	9,7	15,6	0	0	0	19	1
Limonos	9	4,3	10,6	0	0	0	9	0
Quiroga	7	3,4	8,9	0	0	0	7	0
Origen desconocido Guapi	20	9,7	NA	3	12	0	0	5
Otros con origen conocido	10	5	NA	0	0	1	5	4
<b>Total Guapi</b>	<b>147</b>	<b>71,2</b>	<b>NA</b>	<b>4</b>	<b>21</b>	<b>2</b>	<b>106</b>	<b>14</b>
<b>Timbiquí</b>								
El Cuerval	18	8,7	22	0	4	12	2	0
Playa Chacón	13	6,3	33,3	0	3	7	2	1
Otros con origen conocido	2	1	NA	0	1	1	0	0
<b>Total Timbiquí</b>	<b>33</b>	<b>16</b>	<b>NA</b>	<b>0</b>	<b>8</b>	<b>20</b>	<b>4</b>	<b>1</b>
<b>Nariño</b>								
Chico Pérez	6	2,9	10,8	0	2	0	1	3
Chanzará	5	2,4	5,9	0	1	0	2	2
Bagrero	5	2,4	6,1	1	3	0	0	1
Otros con origen conocido	9	4,3	NA	0	1	1	5	2
<b>Total Nariño</b>	<b>25</b>	<b>12</b>	<b>NA</b>	<b>1</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>8</b>	<b>8</b>
<b>Venezuela</b>								
Zona minera <sup>β</sup>	2	1	1640	0	2	0	0	0
<b>Total Venezuela</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>NA</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

$\alpha$  = Estos casos corresponden a reportes procedentes de zona urbana del municipio de Guapi. El resto de localidades tanto de Guapi como de Timbiquí y Nariño corresponden a reportes procedentes de zona rural de la región.

$\beta$  = Se realizó el cálculo de la distancia entre Guapi y el Estado Bolívar, Venezuela, como posible origen de los casos de este país.

NA = No aplica.

**Figura 5-3:** Mapa con la ubicación geográfica de las localidades con mayor número de casos de malaria reportados. Región Guapi-Cauca. 2014-2017.



En cuadros rojos se señalan las localidades rurales en Timbiquí. 1 = El Cuerval. 2 = Playa Chacón.

En cuadros verdes se señalan las localidades rurales en Guapi. 1 = El Carmelo. 2 = San José de Guare. 3 = Limones. 4 = Quiroga.

En cuadros azules se señalan las localidades rurales en Nariño. 1 = Chico Pérez. 2 = Chanzará. 3 = Bagrero.

Por otra parte, el análisis de clonalidad del dendrograma construido a partir del alineamiento de los 71 loci (posiciones) en 121 muestras, incluyendo las muestras procedentes de Venezuela, permitió identificar tres poblaciones principales (A, B y C), al interior de las cuales también se identificaron subpoblaciones, 3 en A, 4 en B y 4 en C. En las localidades rurales de Timbiquí estuvieron más representadas las subpoblaciones de B, mientras que en las localidades rurales de Nariño fueron más frecuentes las subpoblaciones de A. Por otra parte, tanto en la zona urbana como rural de Guapi, se evidenció una distribución heterogénea de las subpoblaciones de A, B y C. Se podría inferir que el movimiento humano en la región se da desde las localidades de Timbiquí y Nariño (ubicados aproximadamente a 15 Km del casco urbano de Guapi) hacia Guapi, haciendo que Guapi se convierta en un receptor de las principales poblaciones del parásito. Los movimientos migratorios humanos desde lugares a mayor distancia que estos 15 Km establecidos, posiblemente sean los responsables del ingreso de nuevos genotipos del parásito en la región. Los datos correspondientes a la distribución de las subpoblaciones de parásitos por localidad de origen de los casos de malaria se presentan en la Tabla 5-3.

**Tabla 5-3.** Distribución de las subpoblaciones de parásitos por localidad de origen de los casos de malaria. Región Guapi-Cauca. 2014-2017.

	A12	A11	A3	B121	B12	B11	B000	C1	C2	C21	C000	TOTAL
Carmelo	7	4	0	0	0	5	0	7	1	1	0	25
San José de Guare	5	3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	9
Limones	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	3
Quiroga	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2
Urbana	1	7	0	6	0	1	0	1	0	1	0	17
Otros Guapi	0	1	0	2	0	2	0	0	0	2	0	7
Desconocido	0	1	0	9	0	0	0	2	4	2	1	19
<b>TOTAL</b>	<b>14</b>	<b>16</b>	<b>0</b>	<b>17</b>	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>12</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>82</b>
Cuerval	0	2	0	10	0	0	0	0	1	0	0	13
Playa Chacón	0	0	0	2	2	0	1	0	1	0	0	6
Otros Timbiquí	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<b>TOTAL</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>13</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>20</b>
Chico Pérez	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
Chanará	0	2	0	0	0	0	0	0	1	1	0	4
Bagrero	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	4
Otros Nariño	0	2	0	0	0	0	0	1	0	1	0	4
<b>TOTAL</b>	<b>0</b>	<b>11</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>17</b>
Venezuela	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2
<b>TOTAL</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>

Subpoblaciones de A: A12, A11, A3

Subpoblaciones de B: B121, B12, B11, B000

Subpoblaciones de C: C1, C2, C21, C000

Con estos datos, la definición operativa de la Unidad de Control de la Región Guapi, corresponde a las localidades alrededor del puesto de diagnóstico de Guapi, que aportan el 90% de los casos de malaria y que están ubicadas en un radio de 15 Km alrededor del casco urbano del municipio. Se debe contar además con aproximadamente 10% de casos de origen urbano.

Las medidas de control deben estar dirigidas tanto a la zona urbana como a la zona rural y deben incluir:

- Diagnóstico y tratamiento oportuno de la malaria.
- Notificación semanal del evento malaria que permita realizar una vigilancia estrecha, de tal forma que se puedan realizar búsquedas activas e intervenciones dirigidas (distribución de toldillos impregnados con insecticidas de larga duración,

identificación y eliminación de criaderos del vector, actividades comunitarias para mejorar adherencia a las intervenciones, entre otras) en aquellas localidades en las cuales se documente un aumento inesperado mayor a 5% en la prevalencia de la enfermedad durante cada semana epidemiológica.

- Estudios de eficacia para el uso de derivados de artemisinina como tratamiento de la malaria no complicada por *P. falciparum* y el seguimiento clínico y parasitológico en los días 1, 2 y 3.
- Realizar un abordaje especial en los asentamientos mineros en la región, con el fin de asegurar diagnóstico oportuno a los casos febriles y búsquedas activas periódicas para realizar el diagnóstico de portadores asintomáticos de la infección.

Para el desarrollo de estas actividades e intervenciones se debe asegurar la contratación permanente y estable de los funcionarios pertenecientes a la Red de Microscopistas y hacer uso de las instalaciones de salud como el Puesto de Limones perteneciente a la ESE de Guapi, optimizando el recurso a través de un trabajo articulado entre todas las instituciones, incluyendo la Secretaría de Salud Departamental del Cauca y la Secretaría Municipal de Salud.

## Referencias

Acuerdo 117 de 1998. Por el cual se establece el obligatorio cumplimiento de las actividades, procedimientos e intervenciones de demanda inducida y la atención de enfermedades de interés en salud pública. Consejo Nacional de Seguridad Social en Salud. Disponible en: [https://www.minsalud.gov.co/Normatividad\\_Nuevo/ACUERDO%20117%20DE%201998.pdf](https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/ACUERDO%20117%20DE%201998.pdf).

Arredondo A. Modelos conceptuales en Salud Pública. Cuad. Med.Soc. de Chile.1993;34:29-36.

Arroyave A. Recuento histórico de la malaria en Antioquia. Rev Epidemiol Antioquia 1999; 243: 145-155.

Asante KP, Zandoh C, Dery DB, Brown C, Adjei G, Antwi-Dadzie Y, Adjuik M, Tchum K, Dosoo D, Amenga-Etego S, Mensah C, Owusu-Sekyere KB, Anderson C, Krieger G, Owusu-Agyei S. Malaria epidemiology in the Ahafo area of Ghana. *Malar J*. 2011;10:211-225.

Bhatt S, Weiss DJ, Cameron E, Bisanzio D, Mappin B, Dalrymple U, et al., The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature*. 2015 Oct 8;526(7572):207-211. doi: 10.1038/nature15535. Epub 2015 Sep 16.

Blair S, Carmona-Fonseca J, Piñeros JG, Ríos A, Álvarez T, Álvarez G et al. Therapeutic efficacy test in malaria falciparum in Antioquia, Colombia. *Malar J* 2006;5:14.

Borrero E, Carrasquilla G, Alexander N. Descentralización y reforma: ¿cuál es su impacto sobre la incidencia de malaria en los municipios colombianos?. *Biomédica* 2012;32(Supl.):68-78.

Castellanos A, Chaparro-Narváez P, Morales-Plaza CD, Alzate A, Padilla J, Arévalo M, Herrera S. Malaria in gold-mining areas in Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016 Jan;111(1):59-66. doi: 10.1590/0074-02760150382.

Chocontá LA, Díaz DP. Observatorio Nacional de Salud. Instituto Nacional de Salud. Minería de oro y aumento de la malaria: ¿qué ocurre en Chocó?. 2017. Disponible en: <https://www.ins.gov.co/Direcciones/ONS/Resumenes%20Ejecutivos/Policy%20brief%20minter%20C3%ADa%20y%20malaria%20en%20choc%C3%B3.pdf>.

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 Jul 22;9:213. doi: 10.1186/1475-2875-9-213.

Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE). Necesidades Básicas Insatisfechas - NBI, por total, cabecera y resto, según municipio y nacional. Colombia. Junio 2012.

Duarte EC, Fontes CJ 2002. Association between reported annual gold-mining extraction and incidence of malaria in Mato Grosso-Brazil, 1985-1996. *Rev Soc Bras Med Trop* 35: 665-668.

Escobar JE. Papel en la transmisión de malaria de las especies de *Kerteszia* en dos zonas endémicas de malaria en Colombia. Tesis del Doctorado Interfacultades en Salud Pública. Universidad Nacional de Colombia. 2012.

Güiza L, Aristizabal JD 2013. Mercury and gold-mining in Colombia: a failed state. *Univ Scie (Bogota)* 18: 33-49.

Instituto Nacional de Salud (INS)–Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública. Informe final malaria, Colombia, 2014.

Instituto Nacional de Salud (INS)–Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública. Informe final del evento malaria, Colombia, 2015.

Instituto Nacional de Salud (INS)–Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública. Informe final del evento malaria, Colombia, 2016.

Instituto Nacional de Salud (INS)–Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública. Informe del evento malaria, hasta el periodo epidemiológico XIII, Colombia, 2017.

Jiménez MM, Hinestroza Y, Gómez RD. Reformas sanitarias e impacto del control de malaria en dos áreas endémicas de Colombia, 1982-2004. *Colomb Med* 2007; 38: 113-131.

Ley 1438 de 2011. Por medio de la cual se reforma el Sistema General de Seguridad Social en Salud y se dictan otras disposiciones. República de Colombia. Disponible en: [https://www.minsalud.gov.co/Normatividad\\_Nuevo/LEY%201438%20DE%202011.pdf](https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/LEY%201438%20DE%202011.pdf).

Ley 550. Por la cual se establece un régimen que promueva y facilite la reactivación empresarial y la reestructuración de los entes territoriales para asegurar la función social de las empresas y lograr el desarrollo armónico de las regiones. República de Colombia. Disponible en: [http://www.minhacienda.gov.co/HomeMinhacienda/ShowProperty;jsessionid=qqF1xvgCLLqqkNg4IGZ8wl0wPRjrgjtLRcuB0v-P9vvdXWQ3vPmX!-1088947312?nodeId=%2FOCS%2FMIG\\_5817359.PDF%2F%2FidcPrimaryFile&revision=latestreleased](http://www.minhacienda.gov.co/HomeMinhacienda/ShowProperty;jsessionid=qqF1xvgCLLqqkNg4IGZ8wl0wPRjrgjtLRcuB0v-P9vvdXWQ3vPmX!-1088947312?nodeId=%2FOCS%2FMIG_5817359.PDF%2F%2FidcPrimaryFile&revision=latestreleased).

Ley 715 de 2001. Por la cual se dictan normas orgánicas en materia de recursos y competencias de conformidad con los artículos 151, 288, 356 y 357 (Acto Legislativo 01 de 2001) de la Constitución Política y se dictan otras disposiciones para organizar la prestación de los servicios de educación y salud, entre otros. Congreso de Colombia. Disponible en: [http://www.minhacienda.gov.co/HomeMinhacienda/ShowProperty;jsessionid=qqF1xvgCLLqqkNg4IGZ8wl0wPRjrgjtLRcuB0v-P9vvdXWQ3vPmX!-1088947312?nodeId=%2FOCS%2FMIG\\_5817363.PDF%2F%2FidcPrimaryFile&revision=latestreleased](http://www.minhacienda.gov.co/HomeMinhacienda/ShowProperty;jsessionid=qqF1xvgCLLqqkNg4IGZ8wl0wPRjrgjtLRcuB0v-P9vvdXWQ3vPmX!-1088947312?nodeId=%2FOCS%2FMIG_5817363.PDF%2F%2FidcPrimaryFile&revision=latestreleased).

Ley Estatutaria 1751 de 2015. Por medio de la cual se regula el derecho fundamental a la salud y se dictan otras disposiciones. Congreso de Colombia. Disponible en: [https://www.minsalud.gov.co/Normatividad\\_Nuevo/Ley%201751%20de%202015.pdf](https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/Ley%201751%20de%202015.pdf).

Méndez F, Muñoz A, Carrasquilla G, Jurado D, Arevalo-Herrera M, Cortese J et al. Determinants of treatment response to sulfadoxine-pyrimethamine and subsequent transmission potential in falciparum malaria. *Am J Epidemiol* 2002;156:230-8.

Ministerio de Salud y Protección Social, Proyecto Malaria Colombia 2010-2015. Logros, retos y lecciones aprendidas Proyecto Malaria Colombia 2010-2015. 2015.

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.

Ministerio de Salud y Protección Social. Plan Decenal de Salud Pública 2012-2021: La salud en Colombia la construyes tú. Bogotá, 2013. Disponible en <https://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/Plan%20Decenal%20-%20Documento%20en%20consulta%20para%20aprobaci%C3%B3n.pdf>.



Ministerio de Salud y Protección Social. Política de atención integral en salud. “Hacia un nuevo modelo de atención integral en salud”. 2016. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/Pol%C3%ADtica%20de%20Atenci%C3%B3n%20Integral%20en%20Salud.pdf>.

Organización Mundial de la Salud (OMS). Organización panamericana de la salud (OPS). Alerta Epidemiológica: Aumento de casos de malaria. 15 de febrero de 2017. Disponible en: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2017/2017-feb-15-phe-alerta-epi-malaria.pdf>.

Organización Mundial de la Salud (OMS). Programa Mundial sobre Paludismo. Terminología del Paludismo. Ginebra, 2017. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/258964/WHO-HTM-GMP-2016.6-spa.pdf;jsessionid=DA423F8A222208A88834FB8FAC0B1BD7?sequence=1>.

Organización panamericana de la salud (OPS). Guía para la reorientación de los programas de control de la malaria con miras a la eliminación. 2011:1-18. Disponible en: <http://www1.paho.org/hq/dmdocuments/2011/Guia-reorient-progr-control-malaria-eliminacion.pdf>.

Ospina OL, Cortés LJ, Cucunubá ZM, Mendoza NM, Chaparro P. Characterization of the national malaria diagnostic network, Colombia, 2006-2010. *Biomedica* 2012; 32 (Suppl 1):46-57.

Phillips MA, Burrows JN, Manyando C, van Huijsduijnen RH, Van Voorhis WC, Wells TNC. Malaria. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Aug 3;3:17050. doi: 10.1038/nrdp.2017.50. Review.

Programa nacional de promoción, prevención y control de enfermedades transmitidas por vectores y zoonosis (Programa Nacional PyP y ETV). Lineamiento para la asignación y ejecución de transferencias nacionales de funcionamiento e inversión 2017 y otras consideraciones para la operación del programa en el marco de la estrategia de gestión integrada. 2017. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/PAI/Lineamiento-programa-pyp-control-enfermedades-transmitidas-vectores-2017.pdf>.

Pwc-PricewaterhouseCoopers 2012. Mining in the Americas. Available from: [pwc.com/ca/en/industries/mining.html](http://pwc.com/ca/en/industries/mining.html).

Resolución 425 de 2008. Por la cual se define la metodología para la elaboración, ejecución, seguimiento, evaluación y control del Plan de Salud Territorial, y las acciones que integran el Plan de Salud Pública de Intervenciones Colectivas a cargo de las entidades territoriales. Ministro de la Protección Social. Disponible en: [https://www.minsalud.gov.co/Normatividad\\_Nuevo/RESOLUCI%C3%93N%20425%20DE%202008.pdf](https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/RESOLUCI%C3%93N%20425%20DE%202008.pdf).

Sanchez JF, Carnero AM, Rivera E, Rosales LA, Baldeviano GC, Asencios JL, Edgel KA, Vinetz JM, Lescano AG. Unstable Malaria Transmission in the Southern Peruvian Amazon and Its Association with Gold Mining, Madre de Dios, 2001-2012. *Am J Trop Med Hyg*. 2017 Feb 8;96(2):304-311. doi: 10.4269/ajtmh.16-0030. Epub 2016 Nov 22.

Secretaría de Salud Departamental del Cauca (SSDC). Plan de contingencia. 2017  
Secretaría de Salud Departamental del Cauca. Área de salud ambiental, programa ETV.  
Plan de contingencia departamental a la transmisión epidémica de malaria. 2017.

Soe HZ, Thi A, Aye NN. Socioeconomic and behavioural determinants of malaria among the migrants in gold mining, rubber and oil palm plantation areas in Myanmar. *Infect Dis Poverty*. 2017 Nov 6;6(1):142. doi: 10.1186/s40249-017-0355-6.

Unidad nacional para la gestión del riesgo de desastres. Colombia y Todos somos Pazcífico. Evaluación social: agua y saneamiento básico en el Pacífico Sur – Guapi y Tumaco. Plan todos somos Pazcífico. 2015. Disponible en: [http://portal.gestiondelriesgo.gov.co/Documents/1.EVALUACION\\_SOCIAL\\_GUAPI\\_Y\\_TUMACO\\_JAN14.pdf](http://portal.gestiondelriesgo.gov.co/Documents/1.EVALUACION_SOCIAL_GUAPI_Y_TUMACO_JAN14.pdf).

Whittaker MA, Dean AJ, Chancellor A. Advocating for malaria elimination - learning from the successes of other infectious disease elimination programmes. *Malar J*. 2014 Jun 5;13:221. doi: 10.1186/1475-2875-13-221.

## 6. Conclusiones y recomendaciones

### 6.1 Conclusiones

Durante el periodo de estudio (2015-2017) y en diferentes momentos de medición, se identificó una prevalencia de 1% (13/1368) de infección asintomática microscópica y de 0,6% (8/1368) de infección asintomática submicroscópica por *P. falciparum*. El hallazgo de infección asintomática microscópica y submicroscópica por *P. falciparum* permite confirmar la presencia de reservorio humano de la infección tanto en zona rural como urbana de la Región Pacífica en el departamento de Cauca, Colombia.

La prueba de PCR directa anidada usando el kit Phusion Blood Direct PCR de Thermo Fisher Scientific fue más sensible al momento de diagnosticar la infección asintomática por malaria, en comparación con la prueba de microscopía de luz convencional o gota gruesa. Además, esta prueba ofrece niveles de sensibilidad iguales a los reportados por la PCR en tiempo real para el diagnóstico de malaria.

Los casos de infección asintomática por malaria presentan una distribución geográfica limitada y definida, siendo más evidentes en el sector de la "L" en la zona urbana en el Barrio Santa Mónica de Guapí, Cauca, comparado con la distribución de los casos de malaria asintomática en las dos playas de la zona rural de El Cuerval, Timbiquí, Cauca.

Se reportó por primera vez en el país el genotipo CVIDI en el gen *pfcr1*, el cual está asociado con resistencia de *P. falciparum* a la cloroquina, además de genotipos del grupo de genes PBG como el VDDNI con mutación en el gen *pfmdr2*, que podrían estar asociados con limitada respuesta terapéutica de *P. falciparum* a los derivados de la artemisinina.

Se identificó una población estructurada de *P. falciparum* con al menos 3 subpoblaciones con diferentes ancestros genéticos puros o mezclados entre sí, cuyos coeficientes de diferenciación genética ( $F_{st}$ ) fueron de 0,84; 0,77 y 0,39, lo cual coincide con las características poblacionales de este parásito en zonas de baja transmisión.

Se detectaron diferentes niveles de serorreactividad a la infección por *P. falciparum* (56%, 562/1003) y *P. vivax* (6,2%, 62/1003), lo cual demuestra exposición previa de la población en zona urbana (barrio Santa Mónica, Guapi, Cauca) y zona rural (El Cuerval, Timbiquí, Cauca) a la infección malárica.

Los epítopes antigénicos PfMSP2 (MSP2 [15-38 B], MSP2 [5-60B], MSP2 [15-34B], MSP2 [5-36A]) y PfMSP1 bloque 2 (MSP1 bk2 Hybrid E [hibrido sintético] y MSP1 bk2 MAD20 Rep [región repetida de MAD20]) fueron considerados como marcadores adecuados de la respuesta serológica a *P. falciparum* en la población estudiada.

El modelo multivariable que mejor predijo el desarrollo de seropositividad para *P. falciparum* incluyó las variables edad, tiempo viviendo en la residencia, ocupación, antecedente previo de malaria y presencia de parasitemia asexual en la gota gruesa.

## 6.2 Recomendaciones

Las medidas de intervención realizadas por la Secretaría Departamental de Salud del Cauca en el municipio de Guapi deben continuar priorizando las zonas de riesgo como el sector de la "L" en el barrio Santa Mónica. Las estrategias deben incluir la vigilancia activa de la infección asintomática por malaria en diferentes momentos epidemiológicos de transmisión, la cual debería ser incluida como actividad rutinaria en programa de Prevención y Control de las enfermedades transmitidas por vectores-ETV.

La vigilancia activa de la infección asintomática debería hacerse usando pruebas de diagnóstico molecular. Para lograrlo, es urgente y necesario asegurar una Red de Microscopistas en la región que garantice el acceso oportuno de la población al diagnóstico y tratamiento de la malaria.

Es recomendable la implementación del uso de la PCR directa para el diagnóstico de malaria en los laboratorios departamentales de salud pública, técnica que ofrece ventajas como tiempo corto en el desarrollo de la prueba, no requiere extracción del ADN parasitario y la posibilidad de recolectar las muestras en papel de filtro, que son fáciles de obtener, almacenar y transportar.

Es necesario aclarar que se requieren condiciones de infraestructura y equipos básicos para el desarrollo de estas pruebas, pero la implementación de las mismas garantiza adecuados niveles de sensibilidad y mejora la detección de casos positivos, principalmente en presencia de parasitemias bajas. El uso de estas pruebas debe hacer parte del sistema de vigilancia epidemiológica para la detección periódica de casos de malaria asintomática en zonas de alta transmisión de malaria en el país como parte de la estrategia de pre-eliminación.

De igual forma, se debe estudiar con detalle cada caso de malaria asintomática con el fin de definir si se trata de un caso “autóctono” o no, y de esta forma, poder orientar de forma más específica las medidas de intervención. Se deben acompañar estos resultados con estudios entomológicos que permitan caracterizar el tipo de vector y su comportamiento.

Es necesario realizar evaluación clínica y microscópica en los días dos y tres post-tratamiento con derivados de la artemisinina para el manejo de la malaria no complicada por *P. falciparum*, con el fin de identificar de forma precoz la falla terapéutica.

Debido a las deficientes condiciones de saneamiento básico identificadas en el lugar, es necesario diseñar estrategias integrales de salud que mejoren el precario saneamiento básico del municipio de Guapi, Cauca y que estén encaminadas al control y eliminación de enfermedades infecto-contagiosas y transmitidas por vectores en la región. Estos objetivos implican la mejora de las condiciones de infraestructura del municipio y del acceso a los servicios de salud.

Se recomienda que para descartar las reacciones cruzadas con el uso de PvDBP como marcador de la respuesta serológica a *P. vivax*, se haga una prueba de absorción de los sueros, mediante la adhesión a la placa de un pool de antígenos provenientes del lisado de *P. falciparum*.

En el marco de las políticas de eliminación de la malaria en el municipio de Guapi, sería necesario implementar la medida de intensidad de transmisión que se constituiría en un indicador de mayor precisión que los índices de prevalencia e incidencia obtenidos en las pruebas rutinarias y que costaría menos que la obtención de la tasa de inoculación entomológica. Una buena opción para determinar la intensidad de transmisión sería el uso de marcadores serológicos como los biomarcadores de exposición usados en esta investigación para identificar la infección por *P. falciparum*.

# A. Anexo: Consentimientos Informados, Aprobación del Comité de Ética y Formato para recolección de datos

## Documento de Consentimiento Informado

**Proyecto:** Herramientas, formación y redes encaminadas a disminuir la carga por malaria en Colombia. **Búsqueda activa.**

### Investigadores Responsables:

Vladimir Corredor, Norman Giovanni Apráez, docentes del departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia

Angélica Knudson Ospina, docente del departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia

Ricardo Sánchez, Instituto de Investigaciones Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia

### Apreciada señor/a:

Queremos invitarlo a usted a participar voluntariamente en el estudio titulado "Herramientas, formación y redes encaminadas a disminuir la carga por malaria en Colombia", para lo cual solicitamos su autorización.

Este documento, que le entregaremos para que lo conserve, contiene la información necesaria para que usted pueda decidir libremente si desea participar en el estudio. A continuación lo leeremos a usted y le solicitamos el favor de que escuche cuidadosamente y haga todas las preguntas que estime convenientes antes de informarnos su decisión.

### -¿Qué es la malaria o paludismo?

La malaria o paludismo es una enfermedad producida por un parásito llamado *Plasmodium*, transmitido por la picadura de un mosquito (zancudo) llamado *Anopheles* que se cría en las aguas quietas y limpias de los ríos o caños. La malaria solamente la sufren los humanos. Después de unos 10 ó 15 días de la picadura de un

mosquito infectado aparecen los primeros síntomas de la malaria, que generalmente son fiebre, escalofrío y sudoración, aunque también puede dar vómito, diarrea y dolor en el cuerpo. Algunas personas a pesar de estar infectadas y con el parásito dentro de su cuerpo no presentan síntomas y a esto se le conoce con el nombre de **malaria asintomática**. Es posible que los parásitos que causan la infección en las personas que tiene síntomas sean diferentes a los parásitos que causan la infección en las personas que **NO** tiene síntomas.

La malaria se trata en Colombia con medicamentos antimaláricos como la cloroquina (Aralen®), la primaquina (Neo-Quipenyl®) y el artemeter más la lumefantrina (Coartem®). El medicamento seleccionado depende del tipo de parásito que causa la infección; en Colombia estos parásitos son: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium malariae*. En ocasiones aunque se tomen estos medicamentos en dosis completas no curan la enfermedad. Una explicación para esto es que el parásito se ha hecho resistente al medicamento. Se conoce que hay algunas estructuras del parásito que cambian cuando éste se hace resistente al medicamento.

### **-¿Qué deseamos hacer?**

Los profesores de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia y los funcionarios de la Secretaría de Salud del Cauca, estamos interesados en conocer quiénes y cuántas personas sufren de malaria asintomática y además conocer la estructura de los parásitos que están causando esta infección. El estudio se llevará a cabo en un lugar en donde hay malaria en el municipio de Guapi en el departamento del Cauca y por ello estamos realizando el trabajo titulado: "Herramientas, formación y redes encaminadas a disminuir la carga por malaria en Colombia".

### **-¿Cómo haremos el estudio y cómo sería su participación en él?**

Para poder realizar el estudio deseamos hacer lo siguiente:

1. Posterior a la realización del censo de los habitantes del lugar, nuevamente visitaremos las casas con el fin de seleccionar a los individuos que cumpla con los requisitos necesarios: ser mayores de 2 años de edad y no tener ni haber presentado sintomatología febril ni escalofríos, sudoración, cefaleas, náuseas y malestar general en la última semana. A estas personas se les realizará una encuesta, se les practicará un examen físico y finalmente, si son asintomáticos, se les tomará una muestra de sangre.
2. La muestra de sangre se tomará mediante punción venosa en el antebrazo y tendrá un volumen aproximado de 4 ml. Una parte de la muestra se utilizará para realizar la gota gruesa (el examen que sirve para saber si usted o su hijo tiene o no malaria), la otra parte será llevada al Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia en Bogotá y será utilizada para confirmar si hay malaria o no, para estudiar la estructura del parásito a través de una técnica de biología molecular conocida como PCR, el cual es un examen especial y para detectar los anticuerpos contra este parásito. El examen de la gota gruesa se realizará el mismo día y los resultados de los otros exámenes tardarán algunas semanas.



3. En caso de ser positivo el examen de gota gruesa, se realizará seguimiento diario con el fin de evaluar la aparición de síntomas y en los días 7 y 14 se tomará nuevamente muestra de gota gruesa por punción digital si el paciente persiste asintomático. Este período podría corresponder al periodo de incubación de la infección. En caso de aparecer síntomas de la malaria en cualquier día de la evaluación, usted recibirá el tratamiento correspondiente o hasta el día 14 si persiste asintomático hasta este momento.
4. Los resultados de los exámenes serán absolutamente confidenciales, usted tendrá acceso a ellos y no serán divulgados sin una autorización escrita de su parte.
5. Es necesario aclarar que las muestras de sangre tomadas no serán utilizadas para ningún tipo de análisis de ADN humano.

**-Riesgos de su participación en el estudio.**

La toma de muestras de sangre no representa ningún riesgo ni para su integridad física ni para la de su hijo siendo el único efecto colateral probable un leve dolor en el sitio de la punción.

**-Beneficios de su participación en el estudio.**

Todas las pruebas de laboratorio que se le realicen a usted ó a su hijo, el medicamento para el tratamiento de la malaria que se la administre en caso de necesitarlo, así como la atención médica prestada serán gratis. Ni usted ni su familia tendrán que pagar por ellos.

**-Derechos de los participantes**

Su participación ó la de su hijo son completamente libres, voluntarias y gratuitas. Si usted decide rechazar esta invitación a participar ó retirarse voluntariamente del estudio en cualquier momento, ello no afectará la atención que usted ó su niño reciba en las entidades de salud, ni perderá ninguno de los beneficios que le corresponden por Ley. Toda la información acerca de usted y su niño será guardada en forma confidencial y anónima. Sólo el personal a cargo del estudio y el Comité de Ética que lo supervisará podrá tener acceso a sus datos personales, ó a los de su hijo.

Las muestras tomadas no serán utilizadas para ningún otro estudio sin su consentimiento.

**-Personas que pueden darle información adicional**

Si usted ahora ó en cualquier otro momento desea hacer una consulta sobre el estudio puede contactar a las siguientes personas:

- Angélica Knudson Ospina. Teléfono: 3165000, Extensiones 15016 y 15172. Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, D.C. [raknudsono@unal.edu.co](mailto:raknudsono@unal.edu.co)

- Vladimir Corredor. Teléfono: 3165000, Extensiones 15032 y 15033. Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, D.C. vcorredore@unal.edu.co

### **-Protección de sus derechos y seguridad**

Para garantizar la protección de los derechos y seguridad suyos y de su hijo, este estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Ética, de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. Si usted desea hacer alguna consulta acerca de los derechos de su hijo(a) como participante en el estudio, sírvase contactar a la Secretaría del Comité de Ética, 3165000, Extensión 15167.

### **Declaración de Consentimiento Informado**

**Proyecto:** Herramientas, formación y redes encaminadas a disminuir la carga por malaria en Colombia. **Búsqueda activa.**

**Si usted autoriza su participación y, en caso necesario, la de su hijo en este estudio, por favor complete los siguientes datos y conserve una copia de este documento.**

Yo, \_\_\_\_\_

Nombre completo de la persona que entrega el consentimiento

(madre ó persona responsable del niño(a))

Declaro que se me han leído y explicado detalladamente, y que he comprendido los objetivos, los procedimientos y demás aspectos relacionados con este estudio y que tuve la posibilidad de hacer preguntas para aclarar mis dudas.

Acepto voluntariamente mi participación en el estudio y, en caso necesario, acepto voluntariamente que mi hijo participe en el estudio. En constancia, firmo a continuación:

\_\_\_\_\_

Firma de la persona que entrega el consentimiento

Cédula de Ciudadanía No. \_\_\_\_\_

Fecha: Día (\_\_\_\_\_) Mes (\_\_\_\_\_) Año (\_\_\_\_\_) \_\_\_\_\_

Nombre completo del profesional que obtuvo el consentimiento

\_\_\_\_\_

Firma del profesional que obtuvo el consentimiento

Cédula de Ciudadanía No. \_\_\_\_\_

Fecha: Día (\_\_\_\_) Mes (\_\_\_\_) Año (\_\_\_\_)

Testigo 1

Testigo 2

Nombre: \_\_\_\_\_

Nombre: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

### 6.3. BENEFICIOS ADICIONALES

La utilización de la muestra en estudios posteriores nos podría ayudar en el futuro a entender las causas y/o el comportamiento de la(s) entidad(es) anteriormente mencionada(s). Se puede dar el caso en donde usted y su familia no se beneficien directamente de estos estudios, pero tanto su familia como otros individuos afectados podrían beneficiarse. Por lo tanto, por favor marque su decisión con respecto al almacenamiento de la muestra y su utilización en estudios de investigación posteriores:

- Deseo que la muestra que me fue extraída sea DESECHADA una vez completado el estudio.
  
- Autorizo conservar la muestra que me fue extraída con la posibilidad de emplearla junto con el resultado del estudio, en las situaciones señaladas a continuación:
  - En estudios complementarios de diagnóstico para mi o algún miembro de mi familia : Si No
  - En estudios de investigación específicos para la(s) entidad(es), objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en anonimato mis datos de identificación : Si No
  - En estudios de investigación de entidades distintas a la(s) entidad(es) objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en anonimato mis datos de identificación: Si No
  - En estudios de investigación colaborativos con otras instituciones nacionales y/o internacionales, siempre y cuando exista acuerdo interinstitucional previo, aprobación del comité de ética y se conserve en anonimato mis datos de identificación: Si No

\_\_\_\_\_  
Firma de la persona que entrega el consentimiento

Cédula de Ciudadanía No. \_\_\_\_\_

Fecha: Día (\_\_\_\_\_) Mes (\_\_\_\_\_) Año (\_\_\_\_\_)

### **Asentimiento del niño**

**Proyecto:** Herramientas, formación y redes encaminadas a disminuir la carga por malaria en Colombia. **Búsqueda activa.**

La Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia y la Secretaría de Salud del Cauca están interesadas en saber cuántas personas tienen malaria, pero no sienten ningún síntoma, es decir, cuántas personas tienen malaria asintomática en Guapi, Cauca, además de saber cuál es la estructura del parásito que causa esta infección. Para ello, estamos haciendo el estudio titulado: "Herramientas, formación y redes encaminadas a disminuir la carga por malaria en Colombia". Para realizar este estudio, un grupo de trabajadores de la salud visitarán las viviendas de un lugar en Guapi, les realizará unas preguntas a las personas que vivan en algunas casas de ese lugar y que no tengan síntomas de la malaria, además de practicarles un examen físico y tomarles una muestra de sangre de la vena del antebrazo.

Esta muestra de sangre sólo se le tomará a usted si desea participar en el estudio y servirá para saber si tienen el parásito causante de la malaria en su sangre. Si los resultados son positivos, lo visitaremos a diario para evaluar la aparición de síntomas y en el día 7 y 14 para tomarle una muestra de sangre de la yema del dedo, para saber si tiene o no el parásito de la malaria en su sangre. En caso de ser positivo para la infección por el parásito que causa malaria en Colombia, usted recibirá el tratamiento correspondiente en el momento en el que aparezcan síntomas de la enfermedad o hasta el día 14 si sigue asintomático.

### **¿Tiene alguna pregunta sobre este estudio relacionado con la malaria asintomática en Guapi, Cauca?**

Si está de acuerdo en participar en este estudio, puede informarnos verbalmente o puede escribir su nombre en el espacio abajo.

\_\_\_\_\_

Nombre del paciente

\_\_\_\_\_

Firma del niño

\_\_\_\_\_

Edad

\_\_\_\_\_

Fecha

\_\_\_\_\_

Firma del testigo

\_\_\_\_\_

Fecha

\_\_\_\_\_

Firma del testigo (consentimiento verbal)

\_\_\_\_\_

Fecha

**Documento de Consentimiento Informado**

**Proyecto:** Herramientas, formación y redes encaminadas a disminuir la carga por malaria en Colombia. **Búsqueda pasiva.**

**Investigadores Responsables:**

Vladimir Corredor, Norman Giovanni Apráez, docentes del departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia

Angélica Knudson Ospina, docente del departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia

Ricardo Sánchez, Instituto de Investigaciones Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia

**Apreciada señor/a:**

Queremos invitarlo a usted a participar voluntariamente en el estudio titulado “Herramientas, formación y redes encaminadas a disminuir la carga por malaria en Colombia”, para lo cual solicitamos su autorización.

Este documento, que le entregaremos para que lo conserve, contiene la información necesaria para que usted pueda decidir libremente si desea participar en el estudio. A continuación lo leeremos a usted y le solicitamos el favor de que escuche cuidadosamente y haga todas las preguntas que estime convenientes antes de informarnos su decisión.

**-¿Qué es la malaria o paludismo?**

La malaria o paludismo es una enfermedad producida por un parásito llamado *Plasmodium*, transmitido por la picadura de un mosquito (zancudo) llamado *Anopheles* que se cría en las aguas quietas y limpias de los ríos o caños. La malaria solamente la sufren los humanos. Después de unos 10 ó 15 días de la picadura de un mosquito infectado aparecen los primeros síntomas de la malaria, que generalmente son fiebre, escalofrío y sudoración, aunque también puede dar vómito, diarrea y dolor en el cuerpo. Algunas personas a pesar de estar infectadas y con el parásito dentro de su cuerpo no presentan síntomas y a esto se le conoce con el nombre de **malaria asintomática**. Es posible que los parásitos que causan la infección en las personas que tiene síntomas sean diferentes a los parásitos que causan la infección en las personas que **NO** tiene síntomas.

La malaria se trata en Colombia con medicamentos antimaláricos como la cloroquina (Aralen®), la primaquina (Neo-Quipenyl®) y el artemeter más la lumefantrina (Coartem®). El medicamento seleccionado depende del tipo de parásito que causa la infección; en Colombia estos parásitos son: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium malariae*. En ocasiones aunque se tomen estos medicamentos en dosis completas no

curan la enfermedad. Una explicación para esto es que el parásito se ha hecho resistente al medicamento. Se conoce que hay algunas estructuras del parásito que cambian cuando éste se hace resistente al medicamento.

### **-¿Qué deseamos hacer?**

Los profesores de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia y los funcionarios de la Secretaría de Salud del Cauca, estamos interesados en conocer la estructura de los parásitos que están causando la malaria en las personas que presentan síntomas. El estudio se llevará a cabo en el municipio de Guapi en el departamento del Cauca y por ello estamos realizando el trabajo titulado: "Herramientas, formación y redes encaminadas a disminuir la carga por malaria en Colombia".

### **-¿Cómo haremos el estudio y cómo sería su participación en él?**

Para poder realizar el estudio deseamos hacer lo siguiente:

1. Se les tomará una muestra de sangre a las personas mayores de 2 años de edad que sean positivas en la gota gruesa para el diagnóstico de la malaria. Estas personas además, no deben haber recibido tratamiento para la malaria o antibióticos dos semanas antes de la muestra, no deben presentar sintomatología o signos de malaria complicada, ni ser mujeres embarazadas.
2. La muestra de sangre se tomará mediante punción venosa en el antebrazo y tendrá un volumen aproximado de 7 ml y será llevada al Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia en Bogotá y será utilizada para estudiar la estructura del parásito a través de una técnica de biología molecular conocida como PCR, el cual es un examen especial. Los resultados del examen tardarán algunas semanas.
3. Los resultados de los exámenes serán absolutamente confidenciales, usted tendrá acceso a ellos y no serán divulgados sin una autorización escrita de su parte.

### **-Riesgos de su participación en el estudio.**

La toma de muestras de sangre no representa ningún riesgo ni para su integridad física ni para la de su hijo siendo el único efecto colateral probable un leve dolor en el sitio de la punción.

### **-Beneficios de su participación en el estudio.**

Todas las pruebas de laboratorio que se le realicen a usted ó a su hijo serán gratis. Ni usted ni su familia tendrán que pagar por ellos.

### **-Derechos de los participantes**

Su participación ó la de su hijo son completamente libres, voluntarias y gratuitas. Si usted decide rechazar esta invitación a participar ó retirarse voluntariamente del estudio en cualquier momento, ello no afectará la atención que usted ó su niño reciba en las entidades de salud, ni perderá ninguno de los beneficios que le corresponden por Ley.

Toda la información acerca de usted y su niño será guardada en forma confidencial y anónima. Sólo el personal a cargo del estudio y el Comité de Ética que lo supervisará podrá tener acceso a sus datos personales, ó a los de su hijo.

Las muestras tomadas no serán utilizadas para ningún otro estudio sin su consentimiento.

**-Personas que pueden darle información adicional**

Si usted ahora ó en cualquier otro momento desea hacer una consulta sobre el estudio puede contactar a las siguientes personas:

- Angélica Knudson Ospina. Teléfono: 3165000, Extensiones 15016 y 15172. Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, D.C. raknudsono@unal.edu.co
- Vladimir Corredor. Teléfono: 3165000, Extensiones 15032 y 15033. Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, D.C. vcorredore@unal.edu.co

**-Protección de sus derechos y seguridad**

Para garantizar la protección de los derechos y seguridad suyos y de su hijo, este estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Ética, de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. Si usted desea hacer alguna consulta acerca de los derechos de su hijo(a) como participante en el estudio, sírvase contactar a la Secretaría del Comité de Ética, 3165000, Extensión 15167.



### **Declaración de Consentimiento Informado**

**Proyecto:** Herramientas, formación y redes encaminadas a disminuir la carga por malaria en Colombia. **Búsqueda pasiva.**

**Si usted autoriza su participación y, en caso necesario, la de su hijo en este estudio, por favor complete los siguientes datos y conserve una copia de este documento.**

Yo, \_\_\_\_\_

Nombre completo de la persona que entrega el consentimiento

(madre ó persona responsable del niño(a))

Declaro que se me han leído y explicado detalladamente, y que he comprendido los objetivos, los procedimientos y demás aspectos relacionados con este estudio y que tuve la posibilidad de hacer preguntas para aclarar mis dudas.

Acepto voluntariamente mi participación en el estudio y, en caso necesario, acepto voluntariamente que mi hijo participe en el estudio. En constancia, firmo a continuación:

\_\_\_\_\_

Firma de la persona que entrega el consentimiento

Cédula de Ciudadanía No. \_\_\_\_\_

Fecha: Día (\_\_\_\_) Mes (\_\_\_\_) Año (\_\_\_\_)

\_\_\_\_\_

Nombre completo del profesional que obtuvo el consentimiento

\_\_\_\_\_

Firma del profesional que obtuvo el consentimiento

Cédula de Ciudadanía No. \_\_\_\_\_

Fecha: Día (\_\_\_\_) Mes (\_\_\_\_) Año (\_\_\_\_)

Testigo 1

Testigo 2

Nombre: \_\_\_\_\_

Nombre: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

**BENEFICIOS ADICIONALES**

La utilización de la muestra en estudios posteriores nos podría ayudar en el futuro a entender las causas y/o el comportamiento de la(s) entidad(es) anteriormente mencionada(s). Se puede dar el caso en donde usted y su familia no se beneficien directamente de estos estudios, pero tanto su familia como otros individuos afectados podrían beneficiarse. Por lo tanto, por favor marque su decisión con respecto al almacenamiento de la muestra y su utilización en estudios de investigación posteriores:

- Deseo que la muestra que me fue extraída sea DESECHADA una vez completado el estudio.
  
- Autorizo conservar la muestra que me fue extraída con la posibilidad de emplearla junto con el resultado del estudio, en las situaciones señaladas a continuación:
  - En estudios complementarios de diagnóstico para mi o algún miembro de mi familia : Si No
  - En estudios de investigación específicos para la(s) entidad(es), objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en anonimato mis datos de identificación : Si No
  - En estudios de investigación de entidades distintas a la(s) entidad(es) objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en anonimato mis datos de identificación: Si No
  - En estudios de investigación colaborativos con otras instituciones nacionales y/o internacionales, siempre y cuando exista acuerdo interinstitucional previo, aprobación del comité de ética y se conserve en anonimato mis datos de identificación: Si No

\_\_\_\_\_  
Firma de la persona que entrega el consentimiento

Cédula de Ciudadanía No. \_\_\_\_\_

Fecha: Día (\_\_\_\_) Mes (\_\_\_\_) Año (\_\_\_\_)

### **Asentimiento del niño**

**Proyecto:** Herramientas, formación y redes encaminadas a disminuir la carga por malaria en Colombia. **Búsqueda pasiva.**

La Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia y la Secretaría de Salud del Cauca están interesadas en saber cuál es la estructura del parásito que causa la malaria. Para ello, estamos haciendo el estudio titulado: "Herramientas, formación y redes encaminadas a disminuir la carga por malaria en Colombia". Para realizar este estudio, un grupo de trabajadores de la salud tomarán una muestra de sangre de la vena del antebrazo a las personas que sean positivas para malaria en la gota gruesa.

Esta muestra de sangre sólo se le tomará a usted si desea participar en el estudio y servirá para saber cómo es la estructura del parásito causante de la malaria en su sangre.

**¿Tiene alguna pregunta sobre este estudio relacionado con la malaria asintomática en Guapi, Cauca?**

Si está de acuerdo en participar en este estudio, puede informarnos verbalmente o puede escribir su nombre en el espacio abajo.

\_\_\_\_\_  
Nombre del paciente

\_\_\_\_\_  
Firma del niño

\_\_\_\_\_  
Edad

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Firma del testigo

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Firma del testigo (consentimiento verbal)

\_\_\_\_\_  
Fecha

**FORMATO PARA RECOLECCION DE DATOS**

Código (Número del paciente): \_\_\_\_\_ Número de la casa: \_\_\_\_\_ Fecha (dd/mm/aa): \_\_\_\_\_

**I. INFORMACIÓN GENERAL**

1. Nombres: \_\_\_\_\_ Apellidos: \_\_\_\_\_  
Sí es menor de edad, escriba el nombre de los padres: \_\_\_\_\_
2. Edad (años cumplidos): \_\_\_\_\_ Fecha de nacimiento: Día \_\_\_\_ Mes \_\_\_\_ Año \_\_\_\_
3. Género: Masculino: \_\_\_\_\_ 1 Femenino: \_\_\_\_\_ 2
4. Etnia: Negra \_\_\_\_\_ 1 Blanca \_\_\_\_\_ 2 Indígena \_\_\_\_\_ 3 Mestiza \_\_\_\_\_
- (Preguntar cómo se considera)
5. Desde hace cuánto vive en esta casa? (Días, meses o años) (en el lugar en el cual se realizó el censo): \_\_\_\_\_
- \_\_\_\_\_ Teléfono \_\_\_\_\_

6. Afiliación al sistema de seguridad social:

Contributivo _____ 1	Cooameva NuevaEPS SOS (Servicio Occidental de Salud)	Saludcoop
Subsidiado _____ 2	Caprecom SaludVida AIC (Asociación Indígena del Cauca)	Asmetsalud

Vinculado \_\_\_\_\_ 3 Otros \_\_\_\_\_ 4 No tiene carnet \_\_\_\_\_ 5

7. Ocupación:
- Estudiante \_\_\_\_\_ 1 Ama de casa \_\_\_\_\_ 2 Pescador \_\_\_\_\_ 3  
Agricultor \_\_\_\_\_ 4 Minero \_\_\_\_\_ 5 Empleado \_\_\_\_\_ 6  
Profesor \_\_\_\_\_ 7 Desempleado \_\_\_\_\_ 8 NS/NR \_\_\_\_\_ 9  
Otra ocupación, cuál \_\_\_\_\_

**PRESELECCION**

<b>CRITERIOS DE INCLUSION</b>	<b>Sí</b>	<b>No</b>
Edad: Mayor de 2 años.		
¿Ha tenido escalofríos, fiebre y sudoración todos los días desde hace una semana?		
El paciente acepta participar en el estudio. Firma del consentimiento informado o asentimiento en caso de menores de edad (pacientes entre 8 y 17 años de edad)		

<b>CRITERIOS DE EXCLUSION</b>	<b>Sí</b>	<b>No</b>
Antecedente de haber sufrido de malaria o estar recibiendo antimaláricos en la última semana		
Mujer embarazada		

Cualquier respuesta en alguna de las áreas sombreadas excluye al paciente de participar en el estudio. Si esto ocurre el paciente **NO** es elegible. Por consiguiente agradezca al paciente la colaboración, suspenda la entrevista y envíe al paciente al puesto de malaria para que le entreguen el tratamiento adecuado para su caso.

**I. DATOS CLÍNICOS DE INGRESO:**

**Antecedentes de importancia:**

8. Alguna vez le ha dado malaria en la vida:  
 Sí\_\_\_1 (Mes\_\_\_ Año\_\_\_) No\_\_\_2 NS/NR\_\_\_3
9. Cuántas veces le ha dado malaria en la vida:\_\_\_\_\_
10. Cuál fue la especie infectante en el último episodio:  
*P. vivax*: \_\_\_1 *P. falciparum*: \_\_\_2 Mixta: \_\_\_3  
 NS/NR\_\_\_4  
 Tratamiento recibido: \_\_\_\_\_
11. Alguna vez lo han hospitalizado por malaria en la vida:  
 Sí\_\_\_1 (Mes\_\_\_ Año\_\_\_) No\_\_\_2 NS/NR\_\_\_3
12. Transfusiones en los últimos 6 meses:  
 Sí\_\_\_1 (Mes\_\_\_ Año\_\_\_) No\_\_\_2 NS/NR\_\_\_3
13. Ha recibido preparaciones con plantas para el tratamiento de la malaria alguna vez en su vida:  
 Sí\_\_\_1 (Mes\_\_\_ Año\_\_\_) No\_\_\_2 NS/NR\_\_\_3  
 Cuáles: \_\_\_\_\_
14. Ha recibido medicamentos antimaláricos en las últimas cuatro semanas:  
 Sí\_\_\_1 No\_\_\_2 NS/NR\_\_\_3  
 Si su respuesta es afirmativa, cuál de los siguientes medicamentos antimaláricos recibió:  
 cloroquina (Aralen®)\_\_\_1 primaquina (Neo-Quipenyl®)\_\_\_2  
 artemeter más la lumefantrina (Coartem®)\_\_\_3 amodiaquina (Camoquin®)\_\_\_4  
 mefloquina (Mephaquin®)\_\_\_5 halofantrina (Halfan®)\_\_\_6  
 quinina\_\_\_7 sulfadoxina/pirimetamina  
 (Fansidar®)\_\_\_8
- En la actualidad utiliza toldillo cuando duerme? Sí\_\_\_1 Cuántas noches a la semana?\_\_\_\_\_ No\_\_\_2 NS/NR\_\_\_3

**Examen físico:**

Síntoma	Día 0	Día 7	Día 14
Fecha (día/mes/año)			
Sensación de fiebre o fiebre cuantificada			
Cefalea (dolor de cabeza)			
Escalofríos			

Sudoración			
Dolor osteomuscular o articular			
Dolor abdominal			
Nauseas (deseos de vomitar)			
Vómito			
Diarrea			
Brote en piel			
Disfagia, odinofagia (dolor faríngeo-dolor de garganta)			
Disnea (dificultad respiratoria)			
Tos húmeda			
Tos seca			
Astenia, adinamia (debilidad)			
Anorexia (falta de apetito)			
Otro:			
Otro:			
Otro:			

**1=presente. 2=ausente.**

<b>Signo</b>	<b>Día 0</b>	<b>Día 7</b>	<b>Día 14</b>
Fecha (día/mes/año)			
Pulso (/minuto)			
Frecuencia respiratoria (/minuto)			
Tensión arterial (Sistólica/Diastólica)			
Temperatura axilar (°C)			
Peso (Kg)			

Paciente decaído (astenia, adimania)			
Palidez conjuntival			
Palidez palmar			
Mucosas secas (deshidratación)			
Ictericia (tinte amarillo en ojos o piel)			
Petequias (puntos de sangre en piel)			
Equimosis (morados en la piel)			
Agregados pulmonares (respiración ruidosa)			
Dolor abdominal a la palpación			
Hígado (cm drc der.)			
Bazo (cm drc izq.)			
Déficit neurológico (alteraciones para caminar, en la orientación, pérdida de la conciencia, etc...)			
Otro			
Otro			

1=presente. 2=ausente.

**Resultados de laboratorio**

Prueba	Día 0	Día 7	Día 14
Fecha (día/mes/año)			
Gota gruesa. Especie y Recuento (Asexual y sexual para <i>P. falciparum</i> )			
PCR			

**OBSERVACIONES**

<b>Fecha</b>	<b>Comentario</b>





UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE BOGOTÁ  
FACULTAD DE MEDICINA  
COMITÉ DE ÉTICA  
ACTA DE EVALUACIÓN

CE - 022

ACTA DE EVALUACIÓN: N°. 127-14

Fecha: 11 de diciembre de 2014

Nombre completo del proyecto: "TOOLS, TRAINING AND NETWORKS TO REDUCE MALARIA BURDEN IN THE PACIFIC COAST OF COLOMBIA".

Versión número: 01

Sometido por: los profesores Vladimir Corredor, Ricardo Sánchez y Angélica Knudson

Presentado por: el profesor Vladimir Corredor Espinel, del Departamento

Departamento o Sección: Salud Pública de la Facultad de Medicina

Fecha en que fue sometido a consideración del Comité: 11 de diciembre de 2014

El COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACION DE LA FACULTAD DE MEDICINA. Se constituyó mediante la Resolución 152, (Acta No. 43 del 5 de diciembre de 1996 actualizado mediante resolución 008 (acta 03 de 27 de enero de 2011), de Consejo de Facultad el Comité de Ética de investigación, el cual está regido por la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia que estableció las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Médica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última revisión del año 2000; y el código de regulaciones federales, título 45, parte 46, para la protección de los sujetos humanos, del departamento de salud y servicios humanos de los institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (Junio 18 de 1991).

El Comité de Ética de la Facultad de Medicina certifica que:

1. Sus miembros revisaron los siguientes documentos del presente proyecto:

- ✓ Carta de presentación del proyecto generada por la unidad básica o el departamento.
- ✓ Copia de la evaluación de los jurados o pares académicos que evaluaron y aprobaron el trabajo)
- ✓ Copia del proyecto completo de investigación,
- ✓ Dos resúmenes ejecutivos
- ✓ Dos copias del consentimiento informado (en español y cuando la investigación lo amerite).
- ✓ Hojas de vida resumidas de los investigadores y coinvestigadores del proyecto
- ✓ Consideraciones éticas según resolución 8430 Ministerio de Salud.
- ✓ Resultados de evaluación por otros comités (si aplica)


2. El presente proyecto fue evaluado y aprobado por los siguientes miembros del Comité:

- |   |                                |   |
|---|--------------------------------|---|
| 1 | Amador Luis Roberto            | Departamento de Patología                 |
| 2 | Arteaga Díaz Clara Eugenia     | Departamento de Obstetricia y Ginecología |
| 3 | Guerrero Fonseca Carlos Arturo | Departamento de Ciencias Fisiológicas     |
| 4 | Parra Pineda Mario Orlando     | Departamento de Obstetricia y Ginecología |

Ella/ Jeannette P. AL-

Carrera 30 No. 45-03, FACULTAD DE MEDICINA, Edificio 471 Piso 4°, Oficina 401  
Teléfono: (57-1) 316 5251 Conmutador: (57-1) 316 5000 Ext. 15167 - 15008

Correo electrónico: [eticasalud\\_fmbog@unal.edu.co](mailto:eticasalud_fmbog@unal.edu.co)  
Bogotá, Colombia, Sur América



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
SEDE BOGOTÁ  
FACULTAD DE MEDICINA  
COMITÉ DE ÉTICA  
ACTA DE EVALUACIÓN

**3. El Comité consideró que el presente estudio:**

- a. Es válido desde el punto vista ético. La investigación involucra un riesgo igual al promedio para los sujetos que participan en ella. La investigación se ajusta a los estándares de la buena práctica clínica.
- b. El Comité considera que las medidas que están siendo tomadas para proteger a los sujetos humanos son adecuadas.

**4. El Comité informará inmediatamente a las directivas institucionales:**

- a. Todo desacato de los investigadores a las solicitudes del Comité.
- b. Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.

**5. El Comité informará inmediatamente a las directivas, toda información que reciba acerca de:**

- a. Lesiones o daños a sujetos humanos con motivo de su participación en la investigación. Problemas imprevistos que involucren riesgos para los sujetos u otras personas.
- b. Cualquier cambio o modificación a este proyecto que haya sido revisado y aprobado por este comité.

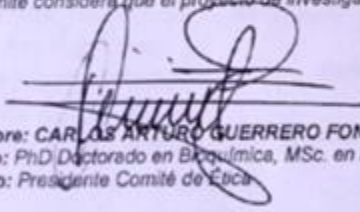
**6. Cuando el proyecto sea aprobado, será por un periodo de un (1) año a partir de la fecha de aprobación.**

**7. El Investigador principal deberá:**

- a. Informar de cualquier cambio que se proponga introducir en el proyecto. Estos cambios no podrán ejecutarse sin la aprobación previa del COMITÉ DE ÉTICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA) excepto cuando sean necesarios para minimizar o suprimir un peligro inminente o un riesgo grave para los sujetos que participan en la investigación.
- b. Avisar de cualquier situación imprevista que se considere implica algún signo de riesgo para los sujetos o la comunidad o el medio en el cual se lleva a cabo el estudio.
- c. Informar de cualquier evento adverso serio de algún paciente, comunicando la situación al secretario y al presidente del Comité de Ética), de acuerdo con la normatividad que el INVIMA a generado a este respecto.
- d. Poner en conocimiento del comité toda información nueva importante respecto al estudio, que pueda afectar la relación riesgo/beneficio de los sujetos participantes.
- e. Comunicar cualquier decisión tomada por otros comités con respecto a la investigación que se lleva a cabo.
- f. Informar de la terminación prematura o suspensión del proyecto explicando las causas o razones.
- g. Presentar a este comité un informe cuando haya transcurrido un año, contado a partir de la aprobación del proyecto. Los proyectos con duración mayor a un año, serán reevaluados a partir del informe de avance integrado.
- h. Todos los proyectos deben entregar al finalizar un informe final de cierre del estudio, este cierre puede ser el informe final en formato completo o en formato de resumen de cierre de estudio, firmado por el investigador responsable del estudio.

**8. Observaciones:**

El comité considera que el proyecto de investigación no presenta dilemas éticos por lo tanto emite **Concepto Aprobatorio**.




Nombre: CARLOS ARTURO GUERRERO FONSECA  
Título: PhD Doctorado en Bioquímica, MSc. en Farmacología y MSc. en Genética Humana  
Cargo: Presidente Comité de Ética

El/./ Jeannette P. AL-

---

Carrera 30 No. 45-03, FACULTAD DE MEDICINA, Edificio 471 Piso 4º, Oficina 401  
Teléfono: (57-1) 316 5251 Comutador: (57-1) 316 5000 Ext. 15167 - 15008  
Correo electrónico: [eticas@ud.fmboc@unal.edu.co](mailto:eticas@ud.fmboc@unal.edu.co)  
Bogotá, Colombia, Sur América



  
**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA**  
SEDE BOGOTÁ  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**COMITÉ DE ÉTICA**  
**ACTA DE EVALUACIÓN**

**ACTA DE EVALUACIÓN: N°. 003-021-16**  
Fecha: 25 de febrero de 2016

Nombre completo del proyecto: "LA VIGILANCIA DE LA MALARIA ASINTOMÁTICA Y SU CONTRIBUCIÓN AL PROGRAMA DE ELIMINACIÓN DE LA MALARIA EN GUAPI CAUCA COLOMBIA".

Versión número: 01

Sometido por: la estudiante Rubiela Angélica Knudson Ospina

Dirigido por: los profesores Vladimir Corredor Espinel y Giovanni Apréx Ippolito

Presentado por: el profesor Mario Esteban Hernández Coordinador

Departamento o Sección: Doctorado en salud Pública de la Facultad de Medicina

Fecha en que fue sometido a consideración del Comité: 25 de febrero de 2016

EL COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACION DE LA FACULTAD DE MEDICINA. Se constituyó mediante la Resolución 152, (Acta No. 43 del 5 de diciembre de 1996 actualizado mediante resolución 008 (acta 03 de 27 de enero de 2011), de Consejo de Facultad el Comité de Ética de investigación, el cual está regido por la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia que estableció las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Médica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última revisión del año 2000; y el código de regulaciones federales, título 45, parte 46, para la protección de los sujetos humanos, del departamento de salud y servicios humanos de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (Junio 18 de 1991).

**1. Sus miembros revisaron los siguientes documentos del presente proyecto:**

- ✓ Carta de presentación del proyecto generada por la unidad básica o el departamento.
- ✓ Copia de la evaluación de los Jurados o pares académicos que evaluaron y aprobaron el trabajo)
- ✓ Copia del proyecto completo de investigación,
- ✓ Dos resúmenes ejecutivos
- ✓ Dos copias del consentimiento informado (en español y cuando la investigación lo amerite).
- ✓ Hojas de vida resumidas de los investigadores y coinvestigadores del proyecto
- ✓ Consideraciones éticas según resolución 8430 Ministerio de Salud.
- ✓ Resultados de evaluación por otros comités (si aplica)


**2. El presente proyecto fue evaluado y aprobado por los siguientes miembros del Comité:**

1	Amador Luis Roberto	Departamento de Patología
2	Arteaga Díaz Clara Eugenia	Departamento de Morfología
3	Duarte Gutiérrez Liz Marcela	Asesora Jurídica Facultad de Medicina
4	Guerrero Fonseca Carlos Arturo	Departamento de Ciencias Fisiológicas
5	Parra Pineda Mario Orlando	Departamento de Obstetricia y Ginecología

El: *Juanita P. M.*

---

Carrera 30 No. 45-03, FACULTAD DE MEDICINA, Edificio 471 Piso 4º, Oficina 136  
Teléfono: (57-1) 316 50 00 Ext. 15167  
Correo electrónico: [eticasalud\\_fmboq@unal.edu.co](mailto:eticasalud_fmboq@unal.edu.co)  
Bogotá, Colombia, Sur América



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
SEDE BOGOTÁ  
FACULTAD DE MEDICINA  
COMITÉ DE ÉTICA  
ACTA DE EVALUACIÓN

**3. El Comité consideró que el presente estudio:**

a. Es válido desde el punto vista ético. La investigación involucra un riesgo igual al promedio para los sujetos que participan en ella. La investigación se ajusta a los estándares de la buena práctica clínica.

b. El Comité considera que las medidas que están siendo tomadas para proteger a los sujetos humanos son adecuadas

**4. El Comité informará inmediatamente a las directivas institucionales:**

a. Todo desacato de los investigadores a las solicitudes del Comité.

b. Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.

**5. El Comité informará inmediatamente a las directivas, toda información que reciba acerca de:**

a. Lesiones o daños a sujetos humanos con motivo de su participación en la investigación Problemas imprevistos que involucren riesgos para los sujetos u otras personas.

b. Cualquier cambio o modificación a este proyecto que haya sido revisado y aprobado por este comité

**6. Cuando el proyecto sea aprobado, será por un periodo de un (1) año a partir de la fecha de aprobación.**

**7. El Investigador principal deberá:**

a. Informar de cualquier cambio que se proponga introducir en el proyecto. Estos cambios no podrán ejecutarse sin la aprobación previa del COMITÉ DE ÉTICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA) excepto cuando sean necesarios para minimizar o suprimir un peligro inminente o un riesgo grave para los sujetos que participan en la investigación.

b. Avisar de cualquier situación imprevista que se considere implica algún signo de riesgo para los sujetos o la comunidad o el medio en el cual se lleva a cabo el estudio.

c. Informar de cualquier evento adverso serio de algún paciente, comunicando la situación al secretario y al presidente del Comité de Ética), de acuerdo con la normatividad que el INVIMA ha generado a este respecto.

d. Poner en conocimiento del comité toda información nueva importante respecto al estudio, que pueda afectar la relación riesgo/beneficio de los sujetos participantes.

e. Comunicar cualquier decisión tomada por otros comités con respecto a la investigación que se lleva a cabo.


f. Informar de la terminación prematura o suspensión del proyecto explicando las causas o razones.

g. Presentar a este comité un informe cuando haya transcurrido un año, contado a partir de la aprobación del proyecto. Los proyectos con duración mayor a un año, serán reevaluados a partir del informe de avance integrado.

h. Todos los proyectos deben entregar al finalizar un informe final de cierre del estudio, este cierre puede ser el informe final en formato completo o en formato de resumen de cierre de estudio, firmado por el investigador responsable del estudio.

**8. Observaciones:**

El comité considera que el proyecto de investigación no presenta dilemas éticos por lo tanto emite **Concepto Aprobatorio**.



Nombre: CARLOS ARTURO GUERRERO FONSECA  
Título: PhD Doctorado en Bioquímica, MSc. en Farmacología y MSc. en Genética Humana  
Cargo: Presidente Comité de Ética

Elb/ Jeannette P. Al.

---

Carrera 30 No. 45-03, FACULTAD DE MEDICINA, Edificio 471 Piso 4º, Oficina 401  
Teléfono: (57-1) 316 50 00 Ext. 15167  
Correo electrónico: [eticasalud\\_fmboq@unal.edu.co](mailto:eticasalud_fmboq@unal.edu.co)  
Bogotá, Colombia, Sur América

## **B. Anexo: Protocolo del Kit-QIAGEN, QIAamp® DNA Micro Kit para extracción de ADN - Esquema general de la estructura de los genes asociados a la resistencia a los antimaláricos**

### **B.1. Protocolo del Kit-QIAGEN, QIAamp® DNA Micro Kit para extracción de ADN**

Este protocolo fue diseñado para extraer ADN de volúmenes entre 0,3 y 2 ml de sangre.

Tipo de muestra: sangre filtrada por columnas de celulosa.

Se preparó previamente el baño de maría a 70 °C.

Se prepararon los buffers AW1 y AW2 de acuerdo con las instrucciones del inserto.

Se incubó a 56 °C el buffer AL cuando se observó la presencia de precipitado.

Todos los pasos de centrifugación fueron realizados a temperatura ambiente. Todos los volúmenes de reactivos se describen para 0,3-1ml o 1-2ml.

Procedimiento:

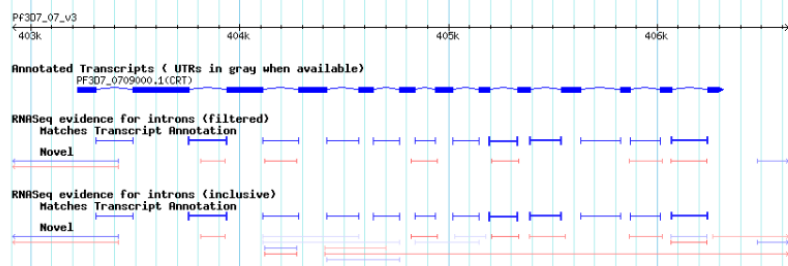
1. Se colocaron 100µl/200µl de la proteasa de Qiagen en un tubo de centrifuga de 15ml y se adicionaron de 0,3 - 1 ml de muestra o entre 1 - 2ml de sangre filtrada por columnas de celulosa. Se adicionaron 1,2 ml o 2,4ml de Buffer AL y se mezcló por inversión del tubo 15 veces seguido de un vortex fuerte al menos por 1 minuto.
2. Se incubó en baño maría a 70 °C durante 10 min.

3. Se adicionaron 1ml /2ml de etanol 96-100% y se mezcló por inversión del tubo 10 veces.
4. Cuidadosamente se transfirió la mezcla anterior a las columnas de QIAmp Midi y esta se introdujo en un tubo de centrifuga de 15ml provisto por el Kit. La mezcla fue centrifugada a 3000rpm durante tres minutos. Este paso fue repetido en muestras de 1-2ml ya que el volumen de la solución era el doble del volumen que tenía la columna.
5. Cuidadosamente se adicionó a la columna 2ml de Buffer AW1 y se centrifugó a 4500 x g (5000rpm) durante 1 minuto. El líquido filtrado fue descartado.
6. Se adicionó a la columna 2ml de Buffer AW2 y se centrifugó 4500 x g (5000rpm) durante 15 minutos.
7. La columna fue puesta en un tubo limpio para recolección de 15ml y se adicionaron de 200µl a 300µl de buffer AE y se centrifugó a 4500 x g (5000rpm) durante 2 minutos.

## B.2. Esquema general de la estructura de los genes asociados a la resistencia a los antimaláricos

### PF3D7\_0709000 chloroquine resistance transporter

**Name:** CRT  
**Type:** protein coding  
**Chromosome:** 07  
**Location:** Pf3D7\_07\_v3:403,222..406,317(+)  
**Species:** Plasmodium falciparum  
**Strain:** 3D7  
**Status:** Curated Reference Strain  
**Chromosome position:**  
 403222-406317

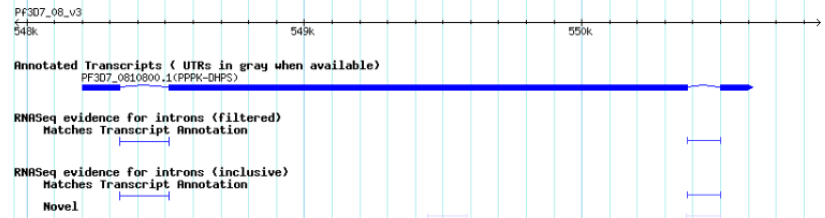


Transcript	# exons	Transcript length	Protein length
PF3D7_0709000.1	13	1275	424



### PF3D7\_0810800 hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase-dihydropteroate synthase

**Name:** PPPK-DHPS  
**Type:** protein coding  
**Chromosome:** 08  
**Location:** Pf3D7\_08\_v3:548,200..550,616(+)  
**Species:** Plasmodium falciparum  
**Strain:** 3D7  
**Status:** Curated Reference Strain  
**Chromosome position:**  
 548200-550616



Transcript	# exons	Transcript length	Protein length
PF3D7_0810800.1	3	2121	706

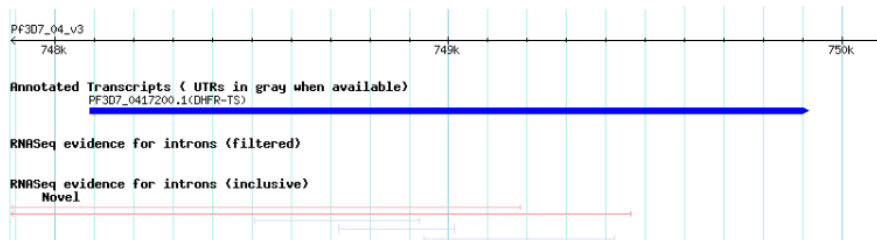


## PF3D7\_0417200 bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase

**Name:** DHFR-TS  
**Type:** protein coding  
**Chromosome:** 04  
**Location:** Pf3D7\_04\_v3:748,088..749,914(+)

**Species:** Plasmodium falciparum  
**Strain:** 3D7  
**Status:** Curated Reference Strain

Chromosome position :  
 748088-749914



Transcript	# exons	Transcript length	Protein length
PF3D7_0417200.1	1	1827	608

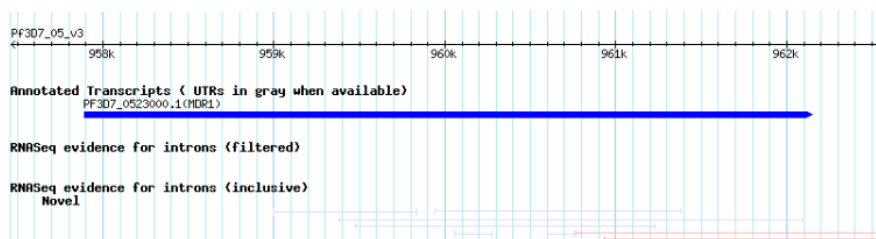


## PF3D7\_0523000 multidrug resistance protein 1

**Name:** MDR1  
**Type:** protein coding  
**Chromosome:** 05  
**Location:** Pf3D7\_05\_v3:957,890..962,149(+)

**Species:** Plasmodium falciparum  
**Strain:** 3D7  
**Status:** Curated Reference Strain

Chromosome position :  
 957890-962149



Transcript	# exons	Transcript length	Protein length
PF3D7_0523000.1	1	4260	1419



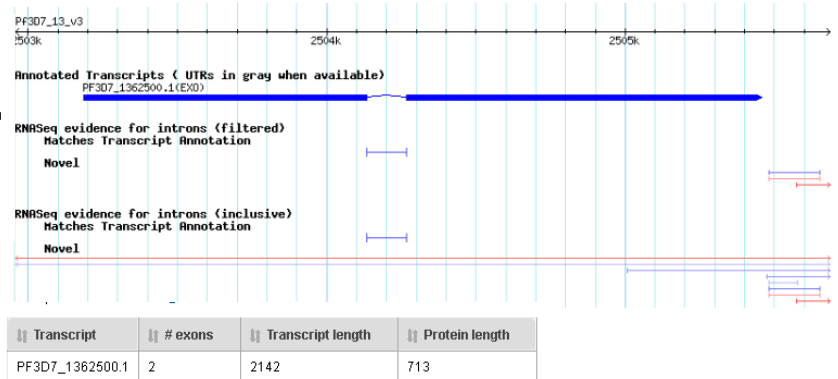


**PF3D7\_1362500** exonuclease, putative

**Name:** EXO  
**Type:** protein coding  
**Chromosome:** 13  
**Location:** Pf3D7\_13\_v3:2,503,185..2,505,458(+)

**Species:** Plasmodium falciparum  
**Strain:** 3D7  
**Status:** Curated Reference Strain

**Chromosome position :**  
 2503185-2505458

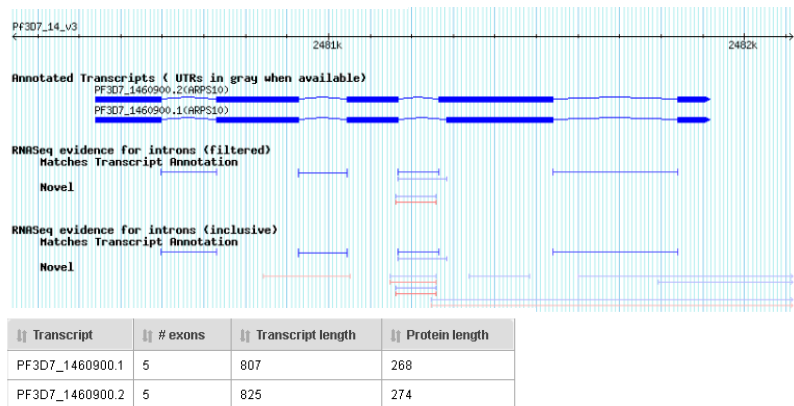


**PF3D7\_1460900** apicoplast ribosomal protein S10, putative

**Name:** ARPS10  
**Type:** protein coding  
**Chromosome:** 14  
**Location:** Pf3D7\_14\_v3:2,480,440..2,481,916(+)

**Species:** Plasmodium falciparum  
**Strain:** 3D7  
**Status:** Curated Reference Strain

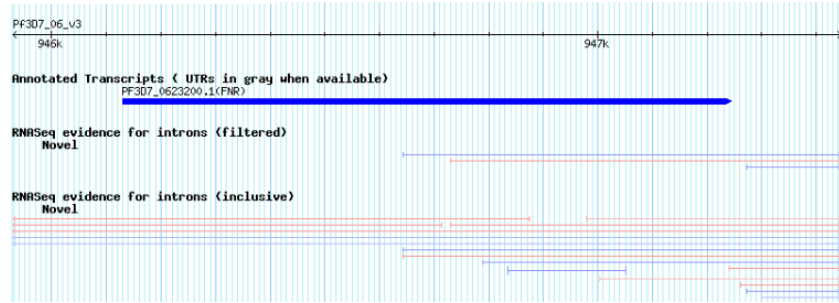
**Chromosome position :**  
 2480440-2481916



## PF3D7\_0623200 ferredoxin--NADP reductase

**Name:** FNR  
**Type:** protein coding  
**Chromosome:** 06  
**Location:** Pf3D7\_06\_v3:946,129..947,244(+)  
**Species:** Plasmodium falciparum  
**Strain:** 3D7  
**Status:** Curated Reference Strain

**Chromosome position:**  
 946129-947244



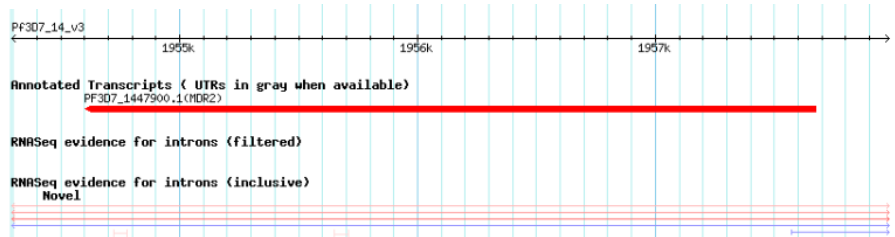
Transcript	# exons	Transcript length	Protein length
PF3D7_0623200.1	1	1116	371



## PF3D7\_1447900 multidrug resistance protein 2

**Name:** MDR2  
**Type:** protein coding  
**Chromosome:** 14  
**Location:** Pf3D7\_14\_v3:1,954,601..1,957,675(-)  
**Species:** Plasmodium falciparum  
**Strain:** 3D7  
**Status:** Curated Reference Strain

**Chromosome position:**  
 complement (1954601-1957675)



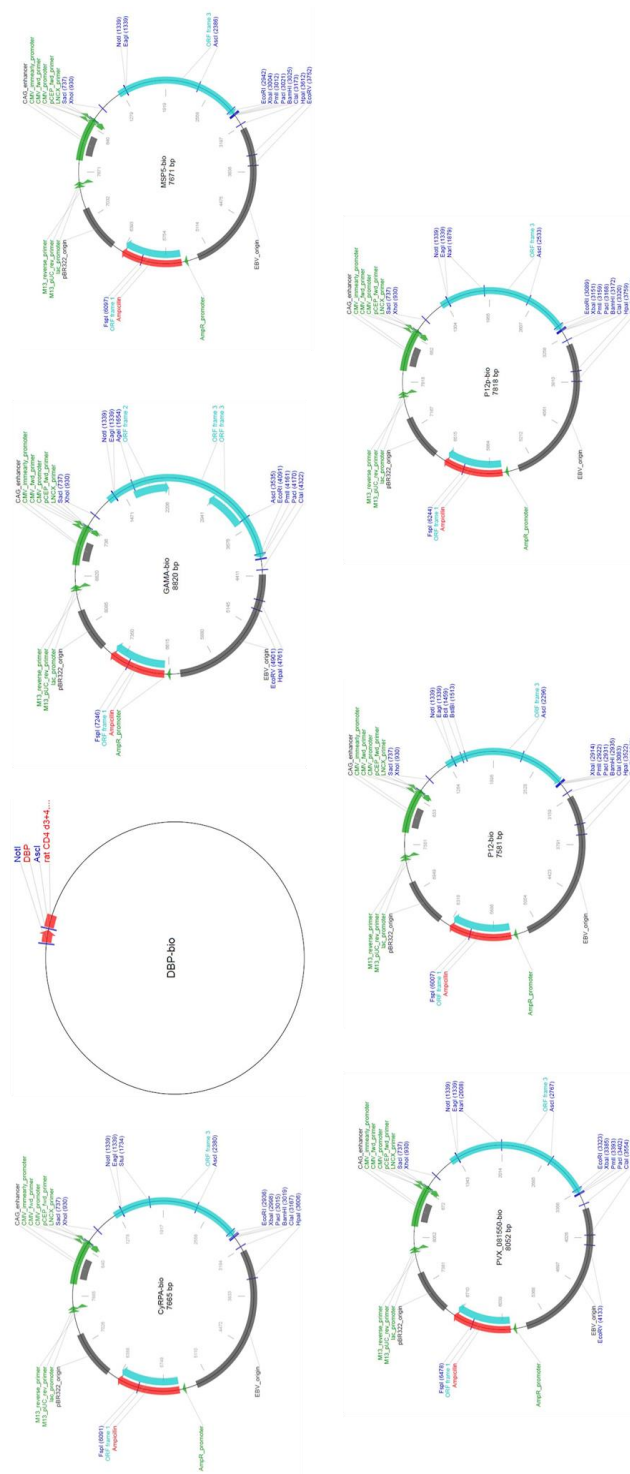
Transcript	# exons	Transcript length	Protein length
PF3D7_1447900.1	1	3075	1024



## C. Anexo: MIDI-prep. Plasmid DNA purification (NucleoBond® Xtra Midi / Maxi)

1. Recuperación del medio de cultivo. Centrifugar el volumen de los frascos de cultivo entre 4500 y 6000 gravedades, a 4 °C durante 15 minutos. Eliminar el sobrenadante y conservar el sedimento.
2. Lisis celular. Reconstituir el sedimento en 8 ml de Buffer de Resuspensión y después de 5 minutos pasar este volumen a tubos de 50 ml. Agregar 8 ml de Buffer de Lisis y mantener a temperatura ambiente durante 5 minutos.
3. Equilibración de las columnas y filtración. Agregar por las paredes de cada columna 12 ml de Buffer de Equilibración.
4. Neutralización. Agregar 8 ml del Buffer de Neutralización a la solución del punto 2 y mezclar cuidadosamente por inversión hasta obtener un color blanco. Centrifugar a 4000 gravedades, a 4 °C durante 5 minutos.
5. Aclaramiento y carga del lisado. Agregar la mayor cantidad de sobrenadante posible del punto anterior en el centro de las columnas previamente equilibradas y dejar filtrar.
6. Lavado. Agregar 5 ml de Buffer de Equilibración por las paredes de la columna.
7. Remoción del filtro. Eliminar el filtro de la columna.
8. Lavado. Agregar 8 ml de Buffer de lavado.
9. Elución. Agregar 5 ml del Buffer de Elución. Asegurar que este volumen sea recogido en un tubo colocado en la parte inferior de la columna.
10. Precipitación. Al volumen obtenido agregar 3.5 ml de Isoporpanolol (no lo suministra el kit), agitar en vortex por unos segundos y centrifugar a 4000 gravedades, a 4 °C durante 30 minutos.
11. Lavado y secado. Eliminar con muchísimo cuidado el sobrenadante. El sedimento es una capa casi transparente adherida al tubo. Agregar al sedimento 2.5 ml de Etanol al 70% (no lo suministra el kit) y centrifugar a 4000 gravedades, a 4 °C durante 5 minutos.
12. Reconstitución. Eliminar con muchísimo cuidado el sobrenadante. El sedimento en este momento es muy escaso, es una capa casi transparente adherida al tubo. Dejar el tubo destapado e inclinado unos minutos, teniendo cuidado de no dejar secar el sedimento. Agregar 500 ul de agua libre de nucleasas y almacenar a -20 °C.
13. Las características de los plásmidos de *Plasmodium falciparum* usados en las transfecciones se pueden encontrar en [https://www.addgene.org/Gavin\\_Wright/](https://www.addgene.org/Gavin_Wright/) y las de *Plasmodium vivax* en [https://www.addgene.org/Julian\\_Rayner/](https://www.addgene.org/Julian_Rayner/).

Esquemas correspondientes a los plásmidos de *Plasmodium vivax* usados en las transfecciones



[https://www.addgene.org/Julian\\_Rayner/](https://www.addgene.org/Julian_Rayner/)

## D. Anexo: Purificación de antígenos de *P. falciparum* y *P. vivax* con imidazol

Reactivos:

Buffer de Unión (Imidazol 40mM):

Solución madre de Imidazol 2 M	10 ml
Cloruro de sodio 0.5 M	10 ml
Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 10X	50 ml
Agua desionizada	Completar para un volumen final de 500 ml

Buffer de Elución (Imidazol 400mM):

Solución madre de Imidazol 2 M	100 ml
Cloruro de sodio 0.5 M	10 ml
Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 10X	50 ml
Agua desionizada	Completar para un volumen final de 500 ml

Procedimiento:

1. Posterior a la transfección y 6 días después de incubación, se centrifugó el contenido de cada frasco con el cultivo celular a 2500 revoluciones por minuto, a 4 °C durante 5 minutos. Este paso tuvo como objetivo eliminar las células.
2. Con el fin de eliminar los residuos, se pasó el sobrenadante a frascos para filtración al vacío (Corning® bottle-top vacuum filter system. CLS431098 SIGMA). Filtrar a 2100 mmHg y -30 Kpa.

3. Al volumen final posterior a filtrar se le agregó 300  $\mu$ l de la resina o esferas de níquel (HisPur Ni-NTA Resin. Thermo Scientific™. Catalog number: 88221). Se dejaron inclinados y en rotación durante 3 horas.
4. Se filtró por columnas de polipropileno (Qiagen Ref. 34964) con el fin de retener las esferas de níquel). Antes de iniciar el filtrado, se agregaron por las paredes de la columna 10 ml de Buffer de Unión.
5. Se agregó lentamente la solución con la resina a través de las columnas mezclando suavemente antes de agregar. Al finalizar, se agregaron 10 ml de Buffer de Unión, se enjuagó el frasco y se pasó este volumen final por la columna y se esperó a que filtrara totalmente. Se aspiró con una jeringa el residuo final de volumen y poner el tapón a la columna.

Se agregó entre 200 y 400  $\mu$ l de Buffer de Elución. Se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se succionó con una jeringa pequeña el volumen final, para almacenar a 4 °C.

## E. Anexo: Electroforesis de proteínas

Reactivos:

NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Protein Gels, 1.0 mm, 12-well- Invitrogen™.

See Blue Plus 2. Pre – Stained Protein Standard. LC5925.

Buffer de carga. NuPAGE NP 0007. LDS sample buffer 4X.

Buffer de corrida. NoVEX NP 0001. MOPS SDS. Running buffer 20X.

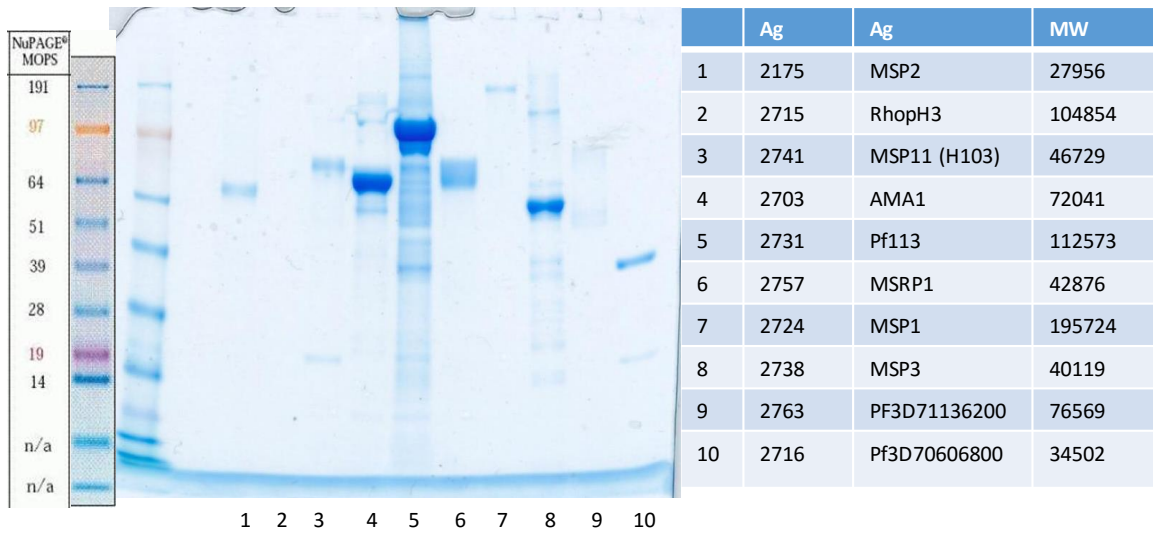
SDS PAGE – Stain.

Procedimiento:

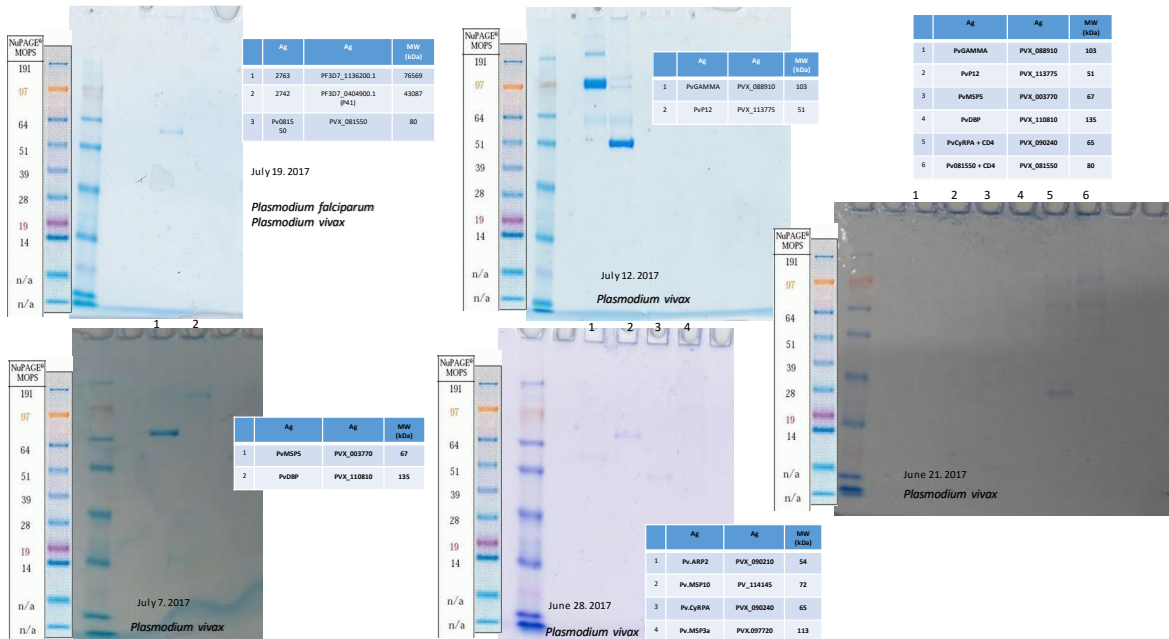
1. Hacer una solución con 5 µl de la muestra de proteína más 5 µl del buffer de carga.
2. Colocar en placa de calentamiento a 95 °C durante 10 minutos.
3. Preparar el Buffer de corrida: 25 ml de MOPS SDS-Running buffer 20X más 475 ml de agua destilada.
4. Colocar el gel de 12 pozos (NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Protein Gels, 1.0 mm, 12-well- Invitrogen™) en la cámara de electroforesis y agregar el Buffer de corrida.
5. Servir 5 µl de los pesos moleculares (See Blue Plus 2. Pre – Stained Protein Standard. LC5925) y los 10 µl de cada muestra en los pozos correspondientes.
6. Condiciones de corrida: 32 a 37 mA, 60 voltios.
7. Colorear el gel. Retirar el gel de la cámara de electroforesis y cubrirlo con SDS PAGE – Stain. Dejar en agitación durante 1 hora.
8. Decolorar con agua. Remover el colorante y dejar en agua y en agitación durante 4 horas.

Resultados de las electroforesis de las proteínas (antígenos) de *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax* realizadas posterior al proceso de purificación.

*Plasmodium falciparum*



April 7. 2017





## F. Anexo: Determinación de proteínas por la técnica de Bradford. Quick Start™ Bradford Protein Assay Gel de proteínas-BIORAD

Realizar la curva de calibración con la albúmina bovina. La concentración inicial de la solución madre es de 2 µg/µl. Se preparan los diferentes tubos patrón así:

1. Se parte de una dilución de 1.5 µl de la solución madre mas 30 µl de agua.

Volumen a partir de la solución 1.5 en 30 µl de agua	Concentración final
1 µl	0.1 µg/µl
3 µl	0.3 µg/µl
5 µl	0.5 µg/µl
7 µl	0.7 µg/µl
10 µl	1 µg/µl

2. A cada tubo se le agrega 1 ml del reactivo Dye Reagent Buffer 1X del kit y se deja en placa de calentamiento durante 5 minutos.

3. De igual forma, para cada 5 ul de antígeno se agrega 1 ml del reactivo Dye Reagent Buffer 1X.

Se procede a realizar las lecturas de las densidades ópticas, se construye la curva patrón y se determinan las concentraciones de las muestras problema.

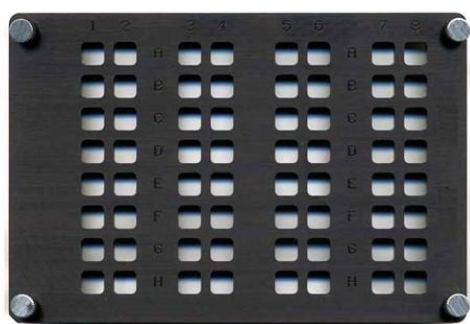
## G. Anexo: Micromatriz (microarray) de proteínas

Reactivos.

Los reactivos se calculan para lo requerido por un cassette de hibridación, es decir el conjunto de 4 láminas. Cada lámina contiene 16 muestras.



Lámina



Caseette de hibridación

Fuente: [http://arrayit.com/Products/Microarray\\_Tools/Multi-Well\\_Microarrays/multi-well\\_microarrays.html](http://arrayit.com/Products/Microarray_Tools/Multi-Well_Microarrays/multi-well_microarrays.html)

PBS 1X	Agua MiliQ	200 ml
	Tabletas de PBS	2
PBS / Tween (0.01%). Buffer de lavado	PBS 1X	120 ml
	Tween 20	12 ul
Buffer de bloqueo (0.25X)	Arrayit 1X Buffer de bloqueo	7.5 ml
	PBS 1X	22.5 ml
Agua destilada ultrapura	40 ml	

Día 1.

1. Hacer el plan de trabajo y diseñar la distribución de antígenos por micromatriz (microarray) y de muestras por caseette.
2. Realizar las diluciones de los antígenos requeridas y servir dichas diluciones en placas de 192 pozos.
3. Agregar muy cuidadosamente 12  $\mu$ l de Buffer de impresión en cada pozo de las placas de 192 pozos.
4. Agregar 12  $\mu$ l de cada dilución de cada antígeno, de acuerdo con la estructura diseñada para cada micromatriz (microarray).
5. Colocar las láminas de 16 micromatrices (microarray) en el robot que imprimirá los antígenos y se hacen la programación del equipo para que imprima los antígenos en cada micromatriz (microarray). El proceso dura toda la noche y el equipo dispensa 10 picolitros por cada micromatriz (microarray).
6. Almacenar el material sobrante a 4 °C.

#### Día 2.

1. Preparar los reactivos.
2. Diluir las muestras 1/400 en Buffer de bloqueo siguiendo el esquema del orden de las muestras previamente diseñado.

#### Día 3.

1. Marcar las láminas que serán utilizadas.
2. Insertar las 4 láminas en cada cassette.
3. Agregar 100  $\mu$ l de Buffer de bloqueo a cada micromatriz (microarray) por cada esquina, usando pipeta multicanal y teniendo cuidado de no tocar la lámina delamicromatriz (microarray).
4. Cubrir los cassettes con papel adhesivo. Poner en plataforma de agitación. Iniciar la agitación muy lentamente y dejar en 100 rpm, a temperatura ambiente durante una hora.
5. Retirar el papel adhesivo y eliminar con fuerza el Buffer de bloque de cada cassette.

6. Agregar 200  $\mu$ l de Buffer de lavado.
7. Colocar los cassettes en agitación a 100 rpm durante 2 minutos. Realizar en total 3 lavados con su respectivo proceso de agitación.
8. Después del último lavado, sacudir cada cassette sobre papel absorbente y agregar 100  $\mu$ l de la dilución de la muestra de acuerdo con el plan diseñado previamente.
9. Cubrir los cassettes con papel adhesivo y dejar en agitación a 100 rpm, temperatura ambiente durante 1 hora.
10. Unos minutos antes de finalizar el punto anterior, preparar el segundo anticuerpo a una dilución de 1/1000 en Buffer de bloqueo. Asegurara un volumen final de 100  $\mu$ l por micromatriz (microarray) más 10 % de pérdidas.
11. Retirar el papel adhesivo y remover con fuerza la dilución de las muestras. Agregar inmediatamente 200  $\mu$ l de Buffer de lavado a cada micromatriz (microarray). Colocar los cassettes en agitación a 100 rpm durante 2 minutos. Realizar en total 3 lavados con su respectivo proceso de agitación.
12. Después del último lavado, sacudir suavemente cada cassette sobre papel absorbente y agregar 100  $\mu$ l del segundo anticuerpo, de acuerdo con el plan diseñado previamente.
13. Cubrir los cassettes con papel adhesivo y dejar en agitación a 100 rpm, temperatura ambiente durante 1 hora.
14. Eliminar la dilución del segundo anticuerpo e inmediatamente agregar 200  $\mu$ l del buffer de lavado a cada micromatriz (microarray). Colocar los cassettes en agitación a 100 rpm durante 2 minutos. Realizar en total 3 lavados con su respectivo proceso de agitación.
15. Desarmar los cassettes y colocar dos laminas verticalmente en un tubo de 50 ml, cuidando que estén ubicadas con la cara de las micromatrices (microarray)s hacia afuera. Centrifugar a 1800 gravedades durante 5 minutos.
16. Colocar las láminas en cajas de seguridad hasta ser llevadas a la lectura.

**Controles:**

1. Positivos: Dos grupos de sueros positivos para *P. falciparum* procedentes de zonas de alta transmisión. Un grupo de sueros positivos para *P. falciparum* procedentes de zonas de baja transmisión.
2. Un suero positivo para *P. falciparum* y otro suero positivo para *P. vivax* ambos procedentes de zonas de alta transmisión.
3. Negativos: Dos grupos de sueros de personas no expuestas.

Nota: El día 3 se realiza en 2 días. Cada día se trabajan 40 láminas, es decir, 640 muestras por día.

## H. Anexo: Productos asociados a la tesis doctoral



CAMBRIDGE  
**INFECTIOUS  
DISEASES**

### RESEARCH TACKLING ANTIMICROBIAL RESISTANCE: SOCIAL AND BIOLOGICAL DIMENSIONS

Programme Tues 6th June 2017

Organized by Cambridge Infectious Diseases  
Interdisciplinary Research Centre  
Twitter @ CamInfectDis / #CIDAMR17  
email: [info@infectiousdisease.cam.ac.uk](mailto:info@infectiousdisease.cam.ac.uk)

 UNIVERSITY OF  
CAMBRIDGE

[www.infectiousdisease.cam.ac.uk](http://www.infectiousdisease.cam.ac.uk)

David Aanensen, Center for Genomic Pathogen Surveillance, Wellcome Trust Sanger Institute/Genome Campus and Imperial College London.

- not available.

### 13. International cooperation in public health problems

Petra Klepac, Visiting Researcher DAMTP, University of Cambridge.

Public health problems, such as emergence of new infectious diseases, control and elimination of existing ones, and the rise of antimicrobial resistance, are increasingly global problems that require international cooperation to be tackled successfully. However, without enforcement from an international body, international cooperation is difficult to achieve. Infectious disease, like many environmental problems such as depletion of the ozone layer, and pollution of air and oceans, are global in nature and the countries cannot solve them by acting unilaterally. International environmental agreements (IEAs) provide a framework for intergovernmental efforts in reducing human impact on the environment. The most successful IEA is the Montreal Protocol to protect Earth's ozone layer. Inspired by the theory of IEAs, this talk presents mathematical framework for analysing self-enforcing agreements for control of infectious diseases and discusses how this approach could be applied to address antimicrobial resistance on a global level.

### Poster Exhibition

#### 1. Salmonella bottleneck-size estimation: a comparison of two methods

R. Dybowski\*, D. J. Price, O. Restif, O. Rossi, A.J. Grant, P. Mastroeni. Department of Veterinary Medicine, University of Cambridge.

The size of a bacterial bottleneck within an organ of a mouse resulting from the administration of an antibiotic is an indication of the efficacy of the antibiotic. We compare two approaches to bottleneck-size estimation. One method is based on the number of isogenic tagged strains missing in a post-bottleneck bacterial population compared to the number present in a pre-bottleneck population. The second, potentially more accurate, approach is based on first estimating the associated bacterial dynamics (i.e., the birth-death-migration parameters) using a recently developed moment-divergence technique, and then estimating bottleneck size via the estimated parameters in conjunction with pre- and post-bottleneck bacterial frequencies. Both methods have been applied to wild-type tagged *Salmonella enterica* Typhimurium and the Delta aroC mutant using ampicillin and ciprofloxacin as the antibiotics.

#### 2. Pre-elimination malaria in Pacific Coast, Colombia

Angélica Knudson<sup>1,2</sup>, María Fernanda Pedreros<sup>1</sup>, Samanta Aponte<sup>1</sup>, Carlos Felipe Castillo<sup>3</sup>, Luz Adriana Olaya<sup>3</sup>, Ricardo Sanchez<sup>4</sup>, Giovanni Apraez<sup>1,3</sup>, Julian C Rayner<sup>5</sup>, Vladimir Corredor<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia; <sup>2</sup>Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia; <sup>3</sup>Secretaría Departamental de Salud del Cauca,



Popayan, Colombia; <sup>4</sup>Departamento de Psiquiatría Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia; <sup>5</sup>Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, UK.

Malaria is the most lethal parasitic infectious disease for humans. The emergence of parasite resistance to antimalarial medicine is an important challenge to global elimination goal and asymptomatic malaria is a challenge in the design of elimination strategies and required to establish reliable surveillance systems and sensitive infection detection. The Colombian Pacific Coast is one of the poorest regions of Colombia and malaria causes a devastating impact on people's health and livelihoods. With the aim of designing elimination strategies, asymptomatic prevalence was determined and profile of antimalarial resistance genotypes characterized in Cauca, on the Colombian Pacific Coast, between 2015 and 2016. Four random and one non-random samples were carried out in a rural and urban areas. Asymptomatic microscopic malaria prevalence was between 0.3 and 2.2% and sub-microscopic was between 0 and 2.1%. In the same time period 223 cases were diagnosed, 99.6 % of them by *Plasmodium falciparum*. A simple mutation in dhfr and dhps was identified in more than 75% and 100% displayed the chloroquine resistance pfcr marker. Low prevalence of asymptomatic malaria was identified and there was a high prevalence of molecular markers of antimalarial resistance in this region.

**3. Antibiotic Resurrection via Programmable RNA-guided Endonuclease Inactivation of Beta-lactamase Resistance Genes Families**

Yoshikazu Gi Mikawa, Frank Massam, Conrad Paul Lichtenstein\* Nemesis Bioscience Ltd, Cambridge.

We use bacterial cybergenetics to resurrect sensitivity to antibiotics in antimicrobial resistant (AMR) pathogens. Our "Nemesis Symbiotics", use a programmable RNA-guided DNA endonuclease gene editing technology to target beta-lactamase (bla) resistance genes. Following delivery on a plasmid vector, a single construct inactivates members of 8 families of bla genes –VIM-, OXA-, NDM-, CTX-M-, KPC-, IMP-, SHV- and TEM (VONCKIST), so resurrecting sensitivity to beta-lactams. Transmids, our novel delivery vectors introduce Symbiotics by infection, when packaged in a 'phage coat, but can also spread to other bacteria by plasmid conjugation –therapeutic applications. Transmid delivery by conjugation from a probiotic disarms the microbiome of AMR genes in anticipation of opportunistic infections –prophylactic applications. Our experiments suggest that multi-functional gene targeting systems may obviate the need for prior diagnostic screens for antibiotic resistance and can be used generally as a companion biological therapeutic together with well-established antibiotics for both therapeutic treatment of infection as well as by prophylactic treatment preventing the spread of AMR.

**4. High-throughput bacterial phenotyping and genotyping to investigate antimicrobial action and resistance**

Josefin Bartholdson Scott\*, Sally Forrest, Dave Goulding, Stephen Reece & Gordon Dougan  
Department of Medicine, University of Cambridge, Cambridge  
Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, Cambridge

We present a novel system where we can image at high-throughput and high enough resolution to define and model phenotypic changes of bacteria during antibiotic treatment and how this changes during development of antimicrobial resistance (AMR). Using phylogenetically characterised bacterial strains covering a broad range of genetic AMR determinants, we will carry out high-throughput confocal microscopy using a Perkin Elmer

# PRE-ELIMINATION MALARIA IN PACIFIC COAST, COLOMBIA

Angélica Knudson<sup>1,2</sup>, María Fernanda Pedreros<sup>1</sup>, Samanta Aponte<sup>1</sup>, Carlos Felipe Castillo<sup>1</sup>, Adriana Olaya<sup>1</sup>, Ricardo Sanchez<sup>2</sup>, Anderson Piamba<sup>3</sup>, Giovanni Apraez<sup>3</sup>, Julian C Rayner<sup>4</sup>, Vladimir Corredor<sup>5</sup>

1. Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia;
2. Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia;
3. Secretaría Departamental de Salud del Cauca, Popayan, Colombia;
4. Departamento de Psiquiatría Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia;
5. Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, UK.

## Introduction

Malaria is the most lethal parasitic infectious disease for humans. The emergence of parasite resistance to antimalarial medicine and the presence of asymptomatic malaria represent a challenge to the global elimination goals. Reliable surveillance systems and sensitive detection of infections are thus required. The most prevalent malaria infection worldwide is caused by *Plasmodium falciparum* (1). The Colombian Pacific Coast is one of the poorest regions of Colombia and malaria has a devastating impact on people's health and livelihoods in this Colombian region. Guapi and Timbiquí are the municipalities most affected by *P. falciparum* malaria in Cauca Department in the Colombian Pacific Region (Annual Parasitic Incidence-API of more than 10 cases/1,000 habitantes). Although malaria transmission is predominantly rural, Guapi has registered presumed cases of urban malaria historically. The recent national policy for the control and prevention of malaria is aimed at eliminating the urban malaria transmission in Guapi by 2021 (2). With the purpose of designing malaria elimination strategies, asymptomatic prevalence was determined and *Pfalciparum* antimalarial resistance genotypes characterized in two localities of Cauca, on the Colombian Pacific Coast, between 2015 and 2016.

## Methods

**Asymptomatic malaria:** Cross-sectional study. Four active random searches for asymptomatic individuals in the peri-urban Santa Mónica neighbourhood of Guapi, and one active non-random search in a rural area in El Cuerval, Timbiquí, were conducted on the Colombian Pacific Coast (between April 2015 and October 2016). Epidemiological and demographic survey was carried out. Asymptomatic individuals were microscopically diagnosed for malaria and blood parasitaemia determined on thick smears. Blood samples on filter paper were subjected to nested PCR amplification of ribosomal DNA using *Plasmodium* universal and specific (*P. falciparum*, *P. vivax* and *P. malariae*) primers (3).

**Drug resistance loci genotyping:** Blood samples in filter paper from asymptomatic malaria patients were obtained at the malaria post in Guapi from August 2014 - June 2016 for rapid sequencing of drug resistance loci and as leukocyte depleted blood for genome sequencing. Parasite DNA was extracted from filter paper and the dhfr, dhfr, pfcrt and kelch13 loci, associated with resistance to sulfadoxine, pyrimethamine, chloroquine (CQ) and artemisinin respectively were amplified and sequenced (4,5).

## Results

### Asymptomatic malaria

We sampled a total of 1265 individuals ranging between 2 and 94 years old. The average demographic profile was, black ethnic (97-100%), student (43-54%) and women (47-51%). All asymptomatic microscopic (13/1265) and sub-microscopic (8/1265) infections were *P. falciparum* infections. A summary of the frequency of microscopic and sub-microscopic asymptomatic malaria infections is presented in Table 1.

Table 1. Frequency of asymptomatic malaria infections as diagnosed by microscopy and PCR.

	April 2015, Santa Mónica (n=267)		October 2015, Santa Mónica (n=267)		April 2016, Santa Mónica (n=267)		October 2016, Santa Mónica (n=267)		December 2016, El Cuerval (n=267)	
	Microscopy	PCR	Microscopy	PCR	Microscopy	PCR	Microscopy	PCR	Microscopy	PCR
<b>Census</b>	1230	815	815	1215	1136	200	200	200	200	200
<b>Individuals surveyed</b>	228	230	228	228	303	303	188	188	188	188
<b>Asymptomatics</b>										
Microscopic (n/N) (%)	13/28	21/28	11/28	11/28	11/30	11/30	4/23	4/23	0/18	0/18
Sub-microscopic (n/N) (%)	0/25	0/25	0/25	0/25	0/25	0/25	0/25	0/25	0/18	0/18
<b>Asymptomatics (Sub-microscopic) (n/N) (%)</b>	0/25	0/25	0/25	0/25	0/25	0/25	0/25	0/25	0/18	0/18
<b>Range Anemia parameters</b>										
Hemoglobin (g/dl)	0.12	0.52	0.12	0.52	0.12	0.52	0.12	0.52	0.12	0.52
Hematocrit (%)	0.21	0.82	0.21	0.82	0.21	0.82	0.21	0.82	0.21	0.82
Hemoglobinopathy (%)	0.72	0.8	0.72	0.8	0.72	0.8	0.72	0.8	0.72	0.8
<b>Genotype</b>										
dhfr (n/N) (%)	66/7	66/7	50	50	100	100	42/3	42/3	0/18	0/18
dhfr (n/N) (%)	22/2	9/9	22/2	9/9	22/2	9/9	9/9	9/9	0/18	0/18
dhfr (n/N) (%)	98	98	100	100	100	100	98	98	0/18	0/18
dhfr (n/N) (%)	975-999	985-100	984-100	984-100	984-100	984-100	975-100	975-100	0/18	0/18

### Drug resistance loci genotyping:

Between August 2014 and June 2016, 223 cases of malaria have been diagnosed at the malaria post in Guapi, 99.6 % of them by *P. falciparum*. The origin of infections was rural and urban of Guapi as well as other nearby municipalities (no more than 20 km radius). Single, double and triple mutants associated to *P. falciparum* sulfadoxine-pyrimethamine resistance were identified. The dhfr single mutants were: 108N 88.1% (2/59), 511.3.4 % (2/59) and 50R 1.7 % (1/59). The dhps single mutants were: 4370.78.2% (43/55) and 581G 1.6% (1/54). There was a one dhfr double mutant (51 I/108 N), one dhps double mutant (437 G/581 G) and another dhfr triple mutant (50 R/51 I/108 N). 100% of the samples (N=18) have displayed the chloroquine resistance marker haplotype CVMET (positions 72-76) at the pfcrt locus, 100% (N=24) have displayed the wild type genotype at the kelch13 gene.



## Discussion and conclusions

Studies in Colombia have reported prevalences for *P. vivax* and *P. falciparum* asymptomatic infections ranging from 0% to 17%, using different diagnostic methods and selection of individuals (6,7,8,9). Here we report a low prevalence of microscopic [between 1 (0.3%; 95% CI: 0.1-1.9) and 5 (2.2%; 95% CI: 0.015-1.1)] and sub-microscopic [between 0 (0%; 95% CI: 0-1.2) and 4 (2.1%; 95% CI: 0.8-5.3)] asymptomatic infections. Most microscopic asymptomatic infections carried sexual parasite forms. These differences could be the result of sampling of asymptomatics at different times during the natural course of infection in areas of unstable, endemo-epidemic transmission. As the contribution of asymptomatic individuals to the maintenance of transmission would depend on the mosquito biting rate over time and the persistence of infectious parasites in asymptomatic individuals, further studies are required to understand the relevance of asymptomatics in low transmission areas.

The non-recommended use of antimalarial drugs constitutes a serious problem for the malaria control effort. In Colombia the combination artemether-lumefantrine is the recommended drug for non-complicated *P. falciparum* malaria. However, the non-recommended use of chloroquine and the SP combination for the treatment of *P. falciparum* infections has been documented. In contrast to the high prevalence (>80%) of wild-type genotypes at the dhfr loci identified ten years ago in the Southwest Pacific Region (10), the current study finds an increase in the frequency of single, double and triple mutant alleles for the dhfr and dhps genes similar to other recent studies (11) in other areas. Likewise, the haplotype CVMET (positions 72-76) at the pfcrt locus associated to chloroquine resistance was detected in all samples evaluated. The wild-type kelch13 gene identified in all samples is consistent with the high efficacy of artemisinin-based combination therapies (ACT) for the treatment of uncomplicated *P. falciparum* malaria in Colombia (12,13). This is probably due to migration fluxes associated with mining and non-formal type of work.

The design of malaria elimination strategies on the Colombian Pacific Coast requires further knowledge of the epidemiological meaning of asymptomatic infections and a strong surveillance system capable to evaluate the evolution of drug resistance parasites and deliver timely healthcare to populations at risk among others.

## References

1. World Health Organization. World Malaria Report 2016.
2. MPPS. P020. Plan Nacional de Salud Pública. P020 2012 - 2021. Minor update [Internet]. 2012 [cited 2012-21]. Available from: <http://www.minisabud.gov.co/Documentos-y-Publicaciones/Plan-Nacional-Documento-en-consulta-para-aprobacion.pdf>
3. Bruchard D, Vignacourt B, Zhu XP, Jara W, Pithonie U, de Roover VE, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol*. 1993;61(2):115-20.
4. Wozniak CR, Pavesi B, Redwood-Klumpp J, Guzman C, Davidson P, Motta D, et al. Inherited antimalarial resistance in southern Africa: a population-based study. *Lancet*. 2003;361(9374):1176-1181.
5. Anay P, Witkowski B, Anwarulungu C, Baghai J, Langousis AC, Zhou H, et al. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2014;507(7481):20-5.
6. Cucunubá ZM, Guerra AP, Piamba A, Piamba R, Piamba J, Piamba D, et al. Asymptomatic *Plasmodium* spp. infection in Timbiquí, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008;103(10):1169-73.
7. Cucunubá ZM, Guerra AP, Piamba JA, Nicolás RS. Comparison of asymptomatic *Plasmodium* spp. infection in two malaria-endemic Colombian localities. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2013 Feb;107(2):123-36.
8. Claino J, Todd J, Beaudou AP, Alvarez D. Prevalence of asymptomatic malaria in endemic areas of Cauca, Colombia. *Bol Oficina Sanitaria Panam*. 2004 Mar;26(1):17-9.
9. Viquez-Jiménez JM, Anzules-Hernández M, Henao-Gutiérrez J, Molina-Dóminez K, Acosta-Piña M, Velázquez AP, Herrera D. Constant prevalence of asymptomatic infections in malaria endemic populations in Colombia over time. *Malar J*. 2016; 15. doi: 10.1186/s12928-016-1126-4.
10. Corredoira V, Quintero C, Schwaninger DP, Ballesteros J, Paredes C, Guerra AP, Davidkin I. Origin and dissemination across the Colombian Pacific coast of sulfadoxine-pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(1):121-5.
11. Hernández DC, Guerra AP, Cucunubá ZM, Nicolás RS, Piamba SM. Haplotypes associated with resistance to sulfadoxine-pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* in two malaria endemic localities in Colombia. *Infect Genet Evol*. 2013 Aug;13:183-90. doi: 10.1016/j.igme.2012.09.017.
12. de Wit M, van Rie M, Parris R, van Rie M, Aico Rivera C, Caballero F, Rizzo SP. Artemisinin: a multidrug-resistant malaria in the Colombian Pacific region: a contemporary real. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012 Dec;35(6):732-8.
13. Aponte S, Guerra AP, Alvarez-Larrosa C, Bernal SD, Restrepo C, González C, Yasaitz MF, Knudson-Angélica A. Baseline in vivo, ex vivo and molecular responses of *Plasmodium falciparum* to artemether and lumefantrine in three endemic zones for malaria in Colombia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2017 Apr 28;1-10. doi: 10.1093/trstmh/trw021.

## Malaria Programme Away Day 2017

21<sup>st</sup> September 2017. Emmanuel College, Cambridge

09:00 – 09:30	Arrival, Tea & Coffee
09:30 – 09:40	Welcome and introduction
09:40 – 11:00 Chair: Dominic	<p><b>Session 1 – Malaria Programme Networks and Pipelines</b></p> <p><b>MalariaGEN</b> - Kirk Rockett, Sonia Goncalves  <b>PlasmoGEM</b> - Ellen Bushell, Theo Sanderson, Mehdi Ghorbal  <b>Single-cell RNA-seq</b> - Arthur Talman  <b>Informatics</b> - Jim Stalker, Adam Reid</p>
11:00 – 11:30	Coffee Break
11:30 – 12:45 Chair: Gavin	<p><b>Session 2 - Interactions: Host-parasite, Protein-protein</b></p> <p>Gavin Band  Ruddy Montandon  Alena Pance  Silvia Kariuki  Sumana Sharma  Gavin Rutledge</p>
12:45 – 13:45	Lunch
13:45 - 15:15 Chair: Mara	<p><b>Session 3 - Notes from the field</b></p> <p>Martin Donnelly</p> <p>Angelica Knudson-Ospina (Colombia)  Ginny Howick (Uganda)  Arthur Talman (Mali)  Cristina Ariani (Ghana)  Brandy St. Laurent (Cambodia)  Alejandro Marin-Menendez (Kenya)</p>
15:15 – 15:45	Coffee Break
15:45 – 16:30 Chair: Marcus	<p><b>Session 4 Know your admin / Flash talks</b></p> <p>Malaria Admin team</p> <p><b>Flash talks from new folks:</b></p> <p>Duncan Ndungu  Sasha Siegel  Emma Carpenter  Hannah Jagoe  Daniele Muraro  Claire Sayers  Elisabet Tinto</p>
16.30 – 17:30	<p><b>Session 5 Quiz!</b></p> <p><i>Hosted by Ruddy, Frank, Alena, Francois, Abrar, and Wiesia</i></p>
17:30 – 20:00	Drinks and Dinner – <i>Revolution Bar</i>

~~21/9/2018~~

ScholarOne Manuscripts



Revista Panamericana de Salud Pública/Pan American Journal of  
Public Health

[Home](#)[Author](#)

## Submission Confirmation

[Print](#)

---

Thank you for your submission

---

**Submitted to**

Revista Panamericana de Salud Pública/Pan American Journal of Public Health

**Manuscript ID**

2018-00869

**Title**

Estrategias para la eliminación de malaria: una perspectiva afro-colombiana

**Authors**

Knudson Ospina, Angelica

Barreto-Z, Yenny

Castillo, Carlos

Olaya , Luz

Mosquera, Liliana

Apraez, Giovanni

Piamba, Anderson

Sánchez, Ricardo

**Date Submitted**

21-Sep-2018