



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

SEROEPIDEMIOLOGÍA DE LA
MALARIA EN ZONAS DE MUY BAJA
TRANSMISIÓN EN LA AMAZONÍA
PERUANA

TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN
INVESTIGACIÓN EPIDEMIOLÓGICA

BRYAN GIANFRANCO FERNANDEZ
CAMACHO

LIMA - PERÚ

2025

ASESOR

PhD. Gabriel Carrasco Escobar

JURADO DE TESIS

PhD. Gianfranco Arroyo Hurtado

PRESIDENTE

PhD. Guillermo Santos Salvatierra Rodriguez

VOCAL

MSc. Stephanie Montero Trujillo

SECRETARIA

DEDICATORIA.

Para Ricardo Fernandez y Rigoberto Camacho

AGRADECIMIENTOS.

Gabriel Carrasco Escobar, PhD

Laboratorio de Innovación en Salud, Universidad Peruana Cayetano Heredia

Chris Drakeley, PhD

Department of Infection Biology, London School of Hygiene and Tropical

Medicine

Gillian Stresman, PhD

Department of Infection Biology, London School of Hygiene and Tropical

Medicine

FUENTES DE FINANCIAMIENTO.

Fundación Bill and Melinda Gates, financiamiento OPP1177272

DECLARACIÓN DE AUTOR			
FECHA	28	MARZO	2025
APELLIDOS Y NOMBRES DEL EGRESADO	FERNANDEZ CAMACHO BRYAN GIANFRANCO		
PROGRAMA DE POSGRADO	MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INVESTIGACIÓN EPIDEMIOLÓGICA		
AÑO DE INICIO DE LOS ESTUDIOS	2022		
TÍTULO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN DE GRADO	SEROEPIDEMIOLOGÍA DE LA MALARIA EN ZONAS DE MUY BAJA TRANSMISIÓN EN LA AMAZONÍA PERUANA		
MODALIDAD DE TRABAJO DE GRADO	Tesis - Desarrollo temático de artículo		
Declaración del Autor			
<p>El presente Trabajo de Grado es original y no es el resultado de un trabajo en colaboración con otros, excepto cuando así está citado explícitamente en el texto. No ha sido ni enviado ni sometido a evaluación para la obtención de otro grado o diploma que no sea el presente.</p>			
Teléfono de contacto (fijo / móvil)	944947946		
E-mail	bryan.fernandez.c@upch.pe		



Firma del Egresado

DNI 75555191

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

I. ARTÍCULO PUBLICADO	1
II. DISCUSIÓN	15
III. REFERENCIAS	37
IV. MATERIAL SUPLEMENTARIO	51
Métodos suplementarios	51
Cuestionarios de recolección de datos	51
Cálculo de la potencia estadística	51
Serología.....	53
Análisis estadístico	54
Selección de variables	54
Regresión lineal segmentada	55
Resultados suplementarios	57
Tablas suplementarias	59

RESUMEN

A pesar de los avances en la reducción de la malaria en Perú, medir la exposición en áreas de baja transmisión es crucial para alcanzar su eliminación. Este estudio se enfocó en dos áreas de transmisión muy baja en Loreto y tuvo como objetivo evaluar la relación entre la exposición a malaria y la proximidad a establecimientos de salud. Se recolectaron datos en 38 comunidades de Indiana y Belén, incluyendo 4000 individuos con hogares georreferenciados y muestras sanguíneas analizadas mediante microscopía, PCR y serología. Se aplicó un modelo de regresión de Poisson multinivel con errores robustos y efectos aleatorios para establecimiento de salud, comunidad y hogar, a fin de estimar razones de prevalencia entre la seropositividad a malaria (reciente e histórica) y las variables de estudio. Asimismo, se utilizó un modelo de regresión lineal segmentada para identificar cambios en las tendencias de seropositividad por grupo etario. La estadística local Getis-Ord G_i^* detectó agrupamientos de hogares con tasas altas (puntos calientes) o bajas (puntos fríos) de exposición. La seropositividad fue de 2.5% (IC95%: 2.0% - 3.0%) para *P. falciparum* y de 7.8% (IC95%: 7.0% - 8.7%) para *P. vivax*, indicando exposición reciente o histórica. La regresión segmentada mostró reducciones en la exposición a *P. vivax* en el grupo de 40 - 50 años ($\beta_1 = 0.043$, $p = 0.003$) y a *P. falciparum* en el grupo de 50 - 60 años ($\beta_1 = 0.005$, $p = 0.010$). Las personas que residían en el cuartil más alejado de los centros de salud presentaron mayor exposición a *P. vivax* (RP reciente = 15.29, IC95%: 5.52 - 42.35, $p < 0.001$; RP histórica = 6.95, IC95%: 3.35 - 14.40, $p < 0.001$) en comparación con quienes vivían en el cuartil más cercano. Este estudio evidenció la seropositividad de

malaria en dos áreas de transmisión muy baja y confirmó el patrón espacial de puntos calientes a medida que aumenta la distancia de las comunidades.

PALABRAS CLAVE

MALARIA, PLASMODIUM FALCIPARUM, PLASMODIUM VIVAX,
SEROPOSITIVIDAD, PERÚ

ABSTRACT

Despite progress in reducing malaria in Peru, measuring exposure in low-transmission areas remains crucial to achieving elimination. This study focused on two very low transmission areas in Loreto and aimed to assess the relationship between malaria exposure and proximity to health facilities. Data were collected in 38 communities of Indiana and Belen, including 4000 individuals with georeferenced households and blood samples analysed by microscopy, PCR, and serology. A multilevel Poisson regression model with robust errors and random effects for health facility, community, and household was applied to estimate prevalence ratios between malaria seropositivity (recent and historical) and study variables. In addition, a segmented linear regression model was used to identify changes in seropositivity trends across age groups, and the local Getis-Ord G_i^* statistic detected clusters of households with high (*hotspots*) or low (*coldspots*) exposure rates. Seropositivity was 2.5% (95% CI: 2.0 - 3.0) for *P. falciparum* and 7.8% (95% CI: 7.0 - 8.7) for *P. vivax*, indicating recent or historical exposure. Segmented regression showed reductions in exposure to *P. vivax* among individuals aged 40 - 50 years ($\beta = 0.043$, $p = 0.003$) and to *P. falciparum* among those aged 50 - 60 years ($\beta = 0.005$, $p = 0.010$). Individuals living in the most distant quartile from health facilities had higher exposure to *P. vivax* (PR recent = 15.29, 95% CI: 5.52 - 42.35, $p < 0.001$; PR historical = 6.95, 95% CI: 3.35 - 14.40, $p < 0.001$) compared with those living in the nearest quartile. This study documented malaria seropositivity in two very low transmission areas and confirmed the spatial pattern of *hotspots* increasing with greater distance from health facilities.

KEY WORDS

MALARIA, PLASMODIUM FALCIPARUM, PLASMODIUM VIVAX,
SEROPOSITIVITY, PERU



OPEN Malaria seroepidemiology in very low transmission settings in the Peruvian Amazon

Bryan Fernandez-Camacho^{1,2,3}, Brian Peña-Calero¹, Martina Guillermo-Roman¹, Jorge Ruiz-Cabrejos¹, Jose Luis Barboza¹, Lucia Bartolini-Arana¹, Antony Barja-Ingaruca¹, Hugo Rodriguez-Ferrucci², Veronica E. Soto-Calle³, Luca Nelli^{4,5}, Isabel Byrne⁶, Monica Hill⁶, Elin Dumont⁴, Lynn Grignard⁴, Kevin Tetteh⁴, Lindsey Wu⁴, Alejandro Llanos-Cuentas³, Chris Drakeley⁴, Gillian Stresman^{4,7} & Gabriel Carrasco-Escobar^{1,8}

Despite progress towards malaria reduction in Peru, measuring exposure in low transmission areas is crucial for achieving elimination. This study focuses on two very low transmission areas in Loreto (Peruvian Amazon) and aims to determine the relationship between malaria exposure and proximity to health facilities. Individual data was collected from 38 villages in Indiana and Belen, including geo-referenced households and blood samples for microscopy, PCR and serological analysis. A segmented linear regression model identified significant changes in seropositivity trends among different age groups. Local Getis-Ord G_i^* statistic revealed clusters of households with high (hotspots) or low (coldspots) seropositivity rates. Findings from 4000 individuals showed a seropositivity level of 2.5% (95%CI: 2.0%–3.0%) for *P. falciparum* and 7.8% (95%CI: 7.0%–8.7%) for *P. vivax*, indicating recent or historical exposure. The segmented regression showed exposure reductions in the 40–50 age group ($\beta_1 = 0.043$, $p = 0.003$) for *P. vivax* and the 50–60 age group ($\beta_1 = 0.005$, $p = 0.010$) for *P. falciparum*. Long and extreme distance villages from Regional Hospital of Loreto exhibited higher malaria exposure compared to proximate and medium distance villages ($p < 0.001$). This study showed the seropositivity of malaria in two very low transmission areas and confirmed the spatial pattern of hotspots as villages become more distant.

Between 1955 and 2021, a total of 40 countries were certified by the World Health Organization (WHO) as malaria-free. This status is achieved when endemic countries report zero indigenous cases of malaria for at least three consecutive years¹. Paraguay, Argentina, and El Salvador obtained this certification in Latin America during that period². The consistent progress in eliminating malaria in this region can be attributed to the implementation of international strategies such as the WHO Global Technical Strategy against Malaria^{3,4}.

According to the 2022 World Malaria Report, Peru reduced its estimated malaria cases by 17,000 between 2019 and 2021⁵. The prevalence of malaria cases in the country is concentrated in the department of Loreto, located within the Peruvian Amazon, where 86% of all recorded cases were found in 2021⁶. Over the past two decades, two national malaria control initiatives were established, with Loreto as the main site of action. The Andean Countries Border Malaria Control Project (PAMAFRO in Spanish), implemented between 2006 and 2010, achieved an 80% reduction in cases. However, after the conclusion of PAMAFRO activities, there was an increase in the number of cases⁷. In Loreto specifically, the number of malaria cases surged from 25,084 in 2012 to 54,342 in 2016. Nevertheless, implementing the Zero Malaria Plan (PMC in Spanish) from 2017 to 2021 led to a significant decline in cases, resulting in a reduction of 75% by 2020^{8,9}.

In January 2022, the Peruvian Ministry of Health (MINSA in Spanish) approved the plan to eliminate malaria in Peru for 2022–2030. The plan set two important goals: reducing cases by 90% by 2030 and eliminating residual malaria from the country by 2045¹⁰. The initial phase of this plan focuses on controlling the spread of the disease

¹Health Innovation Laboratory, Institute of Tropical Medicine "Alexander von Humboldt", Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Peru. ²Universidad Nacional de La Amazonia Peruana, Loreto, Peru. ³Institute of Tropical Medicine "Alexander von Humboldt", Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Peru. ⁴Department of Infection Biology, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, UK. ⁵School of Biodiversity, One Health and Veterinary Medicine, University of Glasgow, Glasgow, UK. ⁶University of Surrey, Guildford, UK. ⁷College of Public Health, Epidemiology Concentration, University of South Florida, Tampa, FL, USA. ⁸Scripps Institution of Oceanography, University of California San Diego, San Diego, CA, USA. ⁹email: bryan.fernandez.c@upch.pe

through reactive case detection in remote areas with low transmission. Factors related to malaria persistence in these areas include *Plasmodium* species (spp) circulating, healthcare-seeking behavior, vector diversity, vector dynamics, sociodemographic determinants, and human mobility patterns^{7,17–19}.

In Loreto, there is a high heterogeneity of malaria transmission at the district level, where districts function as the third-level administrative subunits, with areas of both high and low transmission¹⁴. In regions with high malaria transmission, factors such as climate variables, low levels of treatment adherence, social factors, and limited access to health services contribute to an increased incidence rate of malaria¹⁵. Similarly, in semi-isolated villages with low malaria transmission, variables such as age, circulating *Plasmodium* spp., and previous positive diagnoses are key factors in malaria transmission¹⁶. Furthermore, in low transmission settings or areas where elimination efforts have been implemented, human movement plays a crucial role^{13,17}.

Serological assays, which detect antibodies to malaria parasites, are considered a robust tool for identifying recent or historical malaria exposure¹⁸. Antibodies that correlate to recent (within one year) and historical exposure (within 20 years) to *P. falciparum* and *P. vivax* have been characterised^{19–21}, providing a sensitive method to assess transmission. Estimating recent exposure within a population can be particularly useful in low transmission areas where traditional methods of diagnosing malaria, such as microscopy or rapid diagnostic tests, may not be sensitive enough to detect low numbers of infections. Serology offers insight into a wider timeframe than traditional diagnostics capturing active infections²².

This study aims to evaluate malaria exposure through a panel of serological markers and examine factors such as village proximity to healthcare establishments as an indicator of healthcare accessibility, household spatial distribution, and seropositivity patterns across different age groups in two very low transmission areas of Loreto.

Methods

Study design

A cross-sectional analytical study was conducted in two districts, Indiana and Belén, located in the Loreto department. A total of 38 villages within the study area were selected using a three-stage random sampling method as described in Supplementary Methods. From October to December 2021, a full census of inhabitants in the selected households was conducted, and data such as geographic coordinates, structured questionnaires, and blood samples were collected.

Study area and population

The department of Loreto covers an extensive area of approximately 374000 square kilometers, accounting for over 28% of the total territory of Peru. It is divided into eight provinces and 53 districts, with Iquitos as its capital²³. According to the 2017 census, the estimated population of Loreto was 883510 inhabitants. In 2021, 33.1% of the population lived in poverty, while 6.9% experienced extreme poverty. Additionally, less than 50% of households had access to basic services such as electricity and water sanitation⁴.

Very low transmission areas (< 100 cases per 1000 population Annual Parasite Incidence [API])²⁵ within the Loreto department were identified as target areas (Supplementary Fig. 1). Following the initial assessment, the districts of Indiana and Belén were selected as the study area (Fig. 1a).

According to the 2017 census, Indiana district has a population of 10134 inhabitants, with 62.3% residing in rural areas. Among the population aged 15 years and older (N = 5963), 44.2% had primary education, while 1.6% had complete university studies²⁶. The district experienced peaks of *P. falciparum* API in 2003, 2008 and

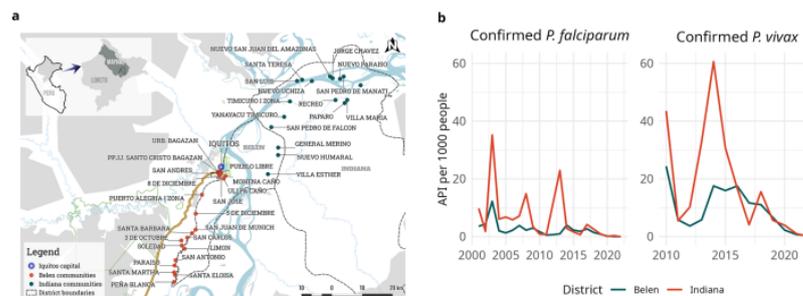


Figure 1. Study area and malaria Annual Parasite Incidence (API) per 1000 people in Indiana and Belén, 2000–2021. The (a) map shows 21 villages belonging to Belén district (dots on the left) and 17 villages belonging to Indiana district (dots on the right), the (b) API per 1000 people was calculated between 2000 and 2021 in Belén and Indiana for *P. falciparum* and *P. vivax*. The map was generated with QGIS software v3.28.3 (QGIS Development Team, 2016, QGIS Geographic Information System, Open Source Geospatial Foundation Project, <http://www.qgis.org/>). The line plot was generated with R software v4.1.2 (R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Austria, <http://www.R-project.org/>).

2013, as well as peaks of *P. vivax* in 2010 and 2014 (Fig. 1b). However, both species showed a decreasing trend of API. The villages in the study area were accessible via the Mazan River, requiring 2–7 h of travel from Iquitos.

In Belen district, the total census population is 64488 inhabitants, with 87.6% in urban areas. Among individuals aged 15 years and older ($N = 42727$), 23.6% had primary education and 7.7% had complete university studies²⁶. Peaks in *P. falciparum* API occurred in 2003, 2007, and 2014 while *P. vivax* peaks were observed in 2010 and 2014, maintaining similar values until 2015 (Fig. 1b). Both species exhibited decreasing trends in API. Villages in this district were accessible via the Canta Gallo road and the Itaya River, with travel times of approximately 1–6 h from Iquitos.

During the pandemic, numerous health activities in Loreto were impacted by the redirection of resources from other diseases to address COVID-19. This resulted in delays in reporting confirmed and tested malaria cases, which affected data availability for decision-making. Furthermore, malaria control efforts, including active detection and vector control, were postponed due to COVID-19²⁷.

Sampling strategy

A stratified three-stage cluster sampling design (Supplementary Fig. 2) was used to select the study subjects. The districts served as strata, and clusters were randomly selected at three levels. In the first stage, the health facilities in each district were classified into four categories of distance (proximate, medium, long, and extreme distance) from the Regional Hospital of Loreto (RHL) and one health facility was randomly selected in each category. Additionally, we defined the health facility catchment area according to their health care report. One health facility in Indiana was excluded as its catchment area had a combined population of less than 400, a prerequisite for inclusion. In the second stage, the health facilities were classified as big or medium-size, according to the population in their catchment area, to identify the number of villages to be sampled in each health facility. In the third stage, households and individuals were censused in those villages with less than 500 inhabitants, while in villages with 500 or more inhabitants, a random selection of households was applied, and all individuals in the selected houses were sampled, following proportional allocation based on the sample size. Furthermore, one village in the health facility "Soledad de Villa Belen" and an entire health facility "Belen de Villa Belen" with four villages in its catchment area were added due to access and availability issues with the initially chosen sample. We included all participants older than three months of age after completion of written informed consent or assent, and excluded individuals younger than three months old because parents may have considered the blood collection procedures inappropriate for this age group. All villages were located within the catchment area of the health facilities of Indiana and Belen.

Data collection

Standardized questionnaires and georeferencing

Household questionnaires were administered to the head of household or immediate caregiver. The questionnaire had one section dedicated to gathering household information and living conditions, such as the total number of household members, availability of insecticide-treated bed nets, household type, main water source, possession of household appliances, and presence of animals.

Individual questionnaires were given to each present household member. The questionnaire consisted of three sections aimed at collecting information on symptoms, medication usage, and healthcare-seeking behavior; factors related to malaria transmission; and human mobility patterns.

All households included in the study were georeferenced using a Garmin 66 s Global Position System (GPS) device.

Blood sample collection

Blood samples were collected through finger prick and stored on slides and filter paper. Thin and thick smears were performed for samples on slides, while serology was conducted for samples on filter paper. The analysis of slide samples was performed by the Universidad Peruana Cayetano Heredia fieldwork team, while the London School of Hygiene and Tropical Medicine analyzed the filter paper samples.

Laboratory procedures

Microscopy

Slides were evaluated by expert microscopists during field work. Thick and thin smears were stained with 10% Giemsa for 10 min and examined for parasite density by counting the number of asexual parasites per 200 leukocytes (L) and assuming a concentration of 8000 L/ μ l. A sample was considered negative if no parasites were detected after examination of 100 microscopy fields²⁸.

Quantitative real-time PCR (qPCR)

Pieces of filter paper with biological samples were cut into ~6 mm² sections for extraction of parasite genomic DNA using the E.Z.N.A.[®] Blood DNA Kit (Omega Bio-tek[®], USA), following the manufacturer's instructions, and stored at 4 °C for immediate use in qPCR and at -20 °C for future use. Diagnostic qPCR was performed following the protocol described by Mangold et al.²⁹, which consists of a semi-nested multiplex PCR (SnM-PCR) that amplifies the 18S rRNA sequence of *Plasmodium* species. This procedure was repeated for *P. vivax* as *P. falciparum* and quantification of parasitaemia was performed by comparing Ct values with a standard curve ranging from 2×10^6 to 2×10^9 copies. According to current MINSA therapeutic guidelines³⁰, parasite carriers detected by qPCR were not treated unless they became positive by microscopy within the next few days or weeks.

Serology

Discs of approximately 3 mm in diameter were cut from the dried blood spot samples using a hole puncher (Rayher 8932400) and each was transferred to an individual well in a 96-well plate (Corning™ 3958, USA). One day prior to processing, antibodies were eluted by adding 400 µL of elution buffer (1 × Phosphate-buffered saline (PBS), 0.05% Tween, 0.5% bovine serum albumin (BSA), 0.02% sodium azide, 0.5% polyvinyl alcohol (PVA), 0.5% polyvinyl pyrrolidone (PVP), 0.1% casein, 15.25 µg/mL *E.coli* lysate) to each well (1/400 dilution), and the plates were incubated for 18 h at 4 °C with shaking (Stuart™ microtitre plate shaker; 500 RPM).

A previously optimised panel of four *P. vivax* and seven *P. falciparum* blood-stage antigens associated with historical and recent malaria exposure (Supplementary Table 1) were coupled to Luminex (Luminex Corporation, Austin, TX, USA) MagPlex® microspheres. Glutathione S-transferase (GST) and tetanus toxoid were included as controls. IgG antibody responses were measured using the Luminex serological assay as described previously³¹. Briefly, antigen-coupled microspheres were co-incubated with 50 µL of eluted samples (1/400 dilution) for 90 min. Two control curves comprising 5-point, fivefold serial dilutions (1/50, 1/250, 1/1250, 1/6250, 1/31,250) of pooled sera from hyper-immune individuals in Kenya (CP3) and Peru (S1) were added to each plate as *P. falciparum* and *P. vivax* positive controls, respectively. The WHO reference reagents for anti-malaria human serum, 10/198 (*P. falciparum*) and 19/198 (*P. vivax*), were also included as positive controls (1/400 dilution). Serum samples from Public Health England (PHE) European blood donors were included as malaria-naïve controls (1/400 dilution). Wells exclusively containing elution buffer served as blanks in each plate for removal of background signal. Following sample incubation, plates were washed with 1xPBS/Tween and incubated with 1/200 AffiniPure Goat Anti-Human IgG R-Phycoerythrin-conjugated secondary antibody (Jackson Immuno Research Laboratories, USA). After a final wash, 100 µL of 1xPBS was added and median fluorescence intensity (MFI) values were recorded using the MAGPIX® instrument.

Classification of seropositivity

Individuals were classified as seropositive or seronegative for long-term (historical) and short-term (recent) exposure to *P. falciparum* and *P. vivax* based on their MFI values for the antigens listed in Supplementary Table 1. These antigens were chosen based on their known immunogenicity and longevity in the immune system. Pf/PvMSP119 and Pf/PvAMA1 persist in the blood for up to 20 years post-exposure, serving as a proxy for historical exposure in an individual's lifetime. On the other hand, Etramp5.Ag1 and PvRBP2b are shorter-lived in the blood and are used to represent recent exposure within the past 6–12 months^{18,19,32}.

To classify individuals as seropositive or seronegative for exposure, unsupervised machine learning K-means clustering algorithms were applied to the MFI values of each antigen independently. This method of classifying MFI values has been used in neglected tropical diseases and malaria studies^{33,34}. The method partitions data into a predetermined number of clusters, and the optimal number of clusters for each antigen was determined using within-cluster sum of squares and average silhouette testing³⁵. For a specific antigen, individuals grouped within the cluster of higher MFI values were classified as seropositive, and individuals within the cluster of lower MFI values were defined as seronegative. If an individual was seropositive to Etramp5.Ag1 or PvRBP2b, they were defined as seropositive for recent exposure to *P. falciparum* or *P. vivax*, respectively. Historical exposure to *P. falciparum* was determined by seropositivity to PfMSP119 and/or PfAMA1. Similarly, seropositivity to PvMSP119 and/or PvAMA1 indicated historical exposure to *P. vivax*.

Data management

We obtained a total sample of 4000 individuals and 980 households through data collection using the REDCap survey manager application on mobile devices. The data underwent rigorous cleaning using R software v4.1.2 (R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Austria), which involved processes of data cross-validation, in-range value checks, duplication of information and others (Supplementary Fig. 3).

All villages in the study were classified into four distance categories according to the district to which they belong: proximate distance (Belen range 144–747 m; Indiana range 766–2382 m), medium distance (Belen range 877–2206 m; Indiana range 2755–4467 m), long distance (Belen range 7162–30,716 m; Indiana range 4588–5916 m), and extreme distance (Belen range 31,354–42,830 m; Indiana range 7138–13,101 m). This classification was based on the distances from each village to two key locations: their health facility or the RHL. The shortest calculated distance to either location was recorded for each village. The villages were then ordered from smallest to largest distance, ensuring an equal number of villages in each category.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with the R software v4.1.2 and QGIS software v3.28.3 was used to generate the study area map.

Categorical descriptive variables were presented as cross-tabulations with district or malaria positivity, and associations were examined using the Fisher test with p-value calculation through Monte Carlo simulation. Numerical variables were summarized using the median and the Interquartile Range (IQR), and differences between calculated medians were assessed using the Mann–Whitney U test. Descriptive plots were generated to observe changes in malaria seropositivity across village, district, and distance categories.

When evaluating the seropositivity through the age groups graphically, a probable change of trend was observed in some age points, therefore, it was considered to complement it with an analysis technique that allows evaluating more than one regression adjustment at the same time in the data, such as segmented regression³⁶. This analysis was applied to determine the age group at which a change in seropositivity trend occurs for each *Plasmodium* spp.³⁷ Prior to the analysis, the eight age groups were recoded taking values from one to eight, in order to be able to estimate the appropriate breakpoint, and subsequently relocate the age group to which it

belongs. The breakpoint was determined iteratively, aiming to maximize the likelihood function and improve the model's fit to the observed data. If the age is below an estimated breakpoint ($U_{1_{age}}$), the original linear regression equation and its coefficients are used. Conversely, a modified equation is derived for age variables exceeding the estimated breakpoint ($U_{1_{age}}$).

For $age \leq U_{1_{age}}$:

$$\text{Seropositivity} = \beta_0 + \beta_1 \times age + \varepsilon$$

For $age > U_{1_{age}}$:

$$\text{Seropositivity} = (\beta_0 + \beta_1 \times U_{1_{age}}) + (\beta_1 + \beta U_1) + (age - U_{1_{age}}) + \varepsilon$$

where β_0 represents the intercept, β_1 represents the slope before the breakpoint ($age \leq U_{1_{age}}$), βU_1 represents the change in slope after the breakpoint ($age > U_{1_{age}}$), and ε represents the random error term.

Additionally, the exposure to malaria in different distance groups was evaluated using the Kruskal Wallis test. Subsequently, multiple comparisons were conducted using the post-hoc Dwass-Steel-Critchlow-Fligner (DSCF) method, which incorporates a single-step correction for p-values.

Spatial analysis

To identify local patterns and clusters of high- and low-level malaria seropositivity rate in the Indiana and Belen districts, we conducted a local spatial autocorrelation analysis using the Getis-Ord G_i^* statistics in the *spdep* package in R³⁸. Prior to the analysis, neighboring households were identified on the basis of geographic coordinates and the maximum distance between them in each district was determined. Then, neighbors were recalculated within an interval from zero to the maximum distance and spatial weights were calculated to assess the importance of close neighbors in each reference household. From that previous evaluation, the Getis-Ord G_i^* statistic was calculated, estimated in Z values with their respective 90%, 95%, and 99% confidence levels to identify hot and cold spots^{39–41}. This identification allows us to evaluate the grouping of observations (households) that share common characteristics with respect to their malaria seroprevalence and the geographic position where they are located. Thus, hot spots are made up of households which are geographically close together with higher seropositivity, and cold spots are made up of households which are close together and have low or zero seropositivity values.

Ethics approval

The study protocol was registered and approved by the Ethics Committee of Universidad Peruana Cayetano Heredia (approval number 201615) and the London School of Hygiene and Tropical Medicine (approval number 19167) prior to implementation. The study adhered to the ethical principles outlined in the Declaration of Helsinki.

All participants provided written informed consent, and for individuals falling below the age of 18 years but exceeding three months, informed assent and consent from a parent or guardian were obtained. Participants had the right to voluntarily withdraw from the study and have their samples removed at any time. All data collected from primary sources was anonymised and devoid of identifiers. The geographic coordinates were used exclusively for analysis purposes and underwent a dispersion procedure thereafter.

Results

Characteristics of study population

A total of 4000 individuals were included in the analysis. The participants, who were predominantly men (51.7%), had a median age of 20 years (IQR: 9.3–45.0). The most frequent education level was primary education (48.2%) and the main economic activities were being a student (28.7%), forest related (26.2%), none (21.7%), and housewives (16.8%). Significant differences ($p < 0.001$) were observed between the two districts for trip in the last month, frequency of never using mosquito nets, self-reported symptoms of muscle or joint pain and self-reported malaria (Table 1).

Laboratory and questionnaire findings

All samples were negative for malaria in microscopy and qPCR. However, we found an overall seropositivity rate of 2.5% for *P. falciparum* and 7.8% for *P. vivax* (Table 1).

Regarding the rate of *P. vivax* seropositivity, recent (4.7%) and historical (5.4%) groups of exposure showed a small difference. Furthermore, significant associations ($p < 0.001$) were found for variables such as sex, district, age groups, and distance categories. In contrast, traveling (trip in the last month) and mosquito nets used were not associated with the *P. vivax* seropositivity rate ($p = 0.875$ and $p = 0.409$, respectively) (Table 2).

In the case of *P. falciparum*, the seropositivity rate was low for recent and historical exposure (0.5% and 2.1%, respectively). In the recent exposure group, none of the variables were associated with malaria seropositivity, while in the historical exposure group, significant associations ($p < 0.001$) were found for distance categories, economic activity, district, age groups and self-reported malaria (Table 2).

Considering the sociodemographic characteristics subdivided by age group, it can be seen that in the youngest group (0 to 20 years old), the number of positive malaria cases is considerably lower than in the general population. Overall, most of the participants are students or have no reported economic activity (93.2%), with some level of education (66.1%). In contrast to the group of adults (20 years and older), where the majority have the economic activity of forest related (49.9%) and housewives (30.7%) and up to 95.9% associated with some level of education (Supplementary Table 2).

Variable	n*	Belen, n = 2029	Indiana, n = 1971	Overall, n = 4000	p
Sex					
Male	4000	1024 (50.5%)	1045 (53.0%)	2069 (51.7%)	0.107
Female		1005 (49.5%)	926 (47.0%)	1931 (48.3%)	
Age groups					
(0–10)	3988	544 (26.9%)	547 (27.8%)	1091 (27.4%)	0.676
(10–20)		453 (22.4%)	471 (24.0%)	924 (23.2%)	
(20–30)		206 (10.2%)	174 (8.9%)	380 (9.5%)	
(30–40)		227 (11.2%)	208 (10.6%)	435 (10.9%)	
(40–50)		182 (9.0%)	181 (9.2%)	363 (9.1%)	
(50–60)		172 (8.5%)	174 (8.9%)	346 (8.7%)	
(60–70)		117 (5.8%)	103 (5.2%)	220 (5.5%)	
(70+)		122 (6.0%)	107 (5.4%)	229 (5.7%)	
Education level					
No schooling	3997	382 (18.8%)	383 (19.4%)	765 (19.1%)	0.546
Primary school		971 (47.9%)	957 (48.6%)	1928 (48.2%)	
Secondary school		618 (30.5%)	588 (29.8%)	1206 (30.2%)	
Higher education		56 (2.8%)	42 (2.1%)	98 (2.5%)	
Economic activities					
None	3997	458 (22.6%)	410 (20.8%)	868 (21.7%)	< 0.001
Forest related		456 (22.5%)	591 (30.0%)	1047 (26.2%)	
Trader		87 (4.3%)	17 (0.9%)	104 (2.6%)	
Housewife		379 (18.7%)	294 (14.9%)	673 (16.8%)	
Student		542 (26.7%)	606 (30.8%)	1148 (28.7%)	
Others		105 (5.2%)	52 (2.6%)	157 (3.9%)	
Trip in the last month					
No	3998	1925 (94.9%)	1684 (85.5%)	3609 (90.3%)	< 0.001
Yes		100 (4.9%)	281 (14.3%)	381 (9.5%)	
Don't know/no answer		4 (0.2%)	4 (0.2%)	8 (0.2%)	
Usual places to bathe					
Bathroom inside the dwelling	3988	392 (19.4%)	63 (3.2%)	455 (11.4%)	< 0.001
Bathroom outside the dwelling		278 (13.7%)	99 (5.0%)	377 (9.5%)	
In the countryside/river		1327 (65.6%)	1710 (87.0%)	3037 (76.2%)	
Other		26 (1.3%)	93 (4.7%)	119 (3.0%)	
Place to sleep last night					
Inside the dwelling	3995	2018 (99.6%)	1961 (99.6%)	3979 (99.6%)	> 0.999
Outside the dwelling		8 (0.4%)	7 (0.4%)	15 (0.4%)	
Don't know/don't answer		1 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (0.0%)	
Mosquito net	3990	1995 (98.5%)	1960 (99.8%)	3955 (99.1%)	< 0.001
Frequency of Mosquito Net					
Never	3988	83 (4.1%)	18 (0.9%)	101 (2.5%)	< 0.001
Every day		1939 (95.8%)	1944 (99.0%)	3883 (97.4%)	
Sometimes		0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
Don't know/don't answer		2 (0.1%)	2 (0.1%)	4 (0.1%)	
Self-reported malaria					
No	3995	1352 (66.7%)	1466 (74.5%)	2818 (70.5%)	< 0.001
Yes		652 (32.2%)	498 (25.3%)	1150 (28.8%)	
Don't know/no answer		22 (1.1%)	5 (0.3%)	27 (0.7%)	
Symptoms or signs in the last month					
Fever	3995	218 (10.8%)	159 (8.1%)	377 (9.4%)	0.004
Headache	4000	210 (10.3%)	206 (10.5%)	416 (10.4%)	0.918
Muscle or joint pain	4000	110 (5.4%)	166 (8.4%)	276 (6.9%)	< 0.001
General malaise	4000	110 (5.4%)	162 (8.2%)	272 (6.8%)	< 0.001
<i>P. falciparum</i> exposure**					
Negative	4000	1954 (96.3%)	1947 (98.8%)	3901 (97.5%)	< 0.001
Positive		75 (3.7%)	24 (1.2%)	99 (2.5%)	
<i>P. vivax</i> exposure**					
Continued					

Variable	n*	Belen, n = 2029	Indiana, n = 1971	Overall, n = 4000	p
Negative	4000	1822 (89.8%)	1865 (94.6%)	3687 (92.2%)	< 0.001
Positive		207 (10.2%)	106 (5.4%)	313 (7.8%)	
Distance category to the regional hospital or health facilities					
Proximate distance	4000	685 (33.8%)	664 (33.7%)	1349 (33.7%)	0.285
Medium distance		366 (18.0%)	326 (16.5%)	692 (17.3%)	
Long distance		500 (24.6%)	531 (26.9%)	1031 (25.8%)	
Extreme distance		478 (23.6%)	450 (22.8%)	928 (23.2%)	

Table 1. Characteristics of study subjects. Fisher's Exact Test for count data is applied. Continuous data are presented as median (interquartile range) and Mann–Whitney U test. *Some variables could not sum 4000 individuals due to missing data. **Overall *Plasmodium* species exposure was determined by the presence of a serological marker of recent or historical exposure.

When analyzing the seropositivity rate by types of exposure (recent and historical) for both *Plasmodium* spp. with the use of antimalarial drugs and whether the person would go to the health facility in case of malaria infection, only a statistically significant association was observed between drug intake and recent *P. vivax* seropositivity ($\chi^2 = 4.50$, $p = 0.034$) as outlined in Supplementary Table 3.

Similar patterns of malaria seropositivity were observed in households for both *Plasmodium* spp. in Indiana and Belen. The households located farthest from the RHL exhibited the highest levels of seropositivity rates (Fig. 2). When stratifying by age group and distance category, we found a rise in malaria seropositivity rate as age increased and villages were situated farther away from their health facilities or the RHL. Furthermore, Indiana exhibited lower levels of seropositivity for both types of exposure in the proximate and medium distance categories compared to Belen villages (Fig. 3). We also compared the exposure to any type of malaria (recent or historical) according to the distance level classifications in the villages. Higher exposure was observed in long and extreme distance villages against those classified as proximate ($DSCF_{\text{long}} = 16.29$, $p < 0.001$; $DSCF_{\text{extreme distance}} = 18.86$, $p < 0.001$) and medium distance ($DSCF_{\text{long}} = 10.48$, $p < 0.001$; $DSCF_{\text{extreme distance}} = 12.53$, $p < 0.001$).

In both *Plasmodium* spp., age groups were found associated with the trend of malaria seropositivity in the segmented linear regression model. In the age group of 40–50 years, there was a significant decline in the seropositivity trend of *P. vivax* ($\beta_1 = 0.043$, $\beta_{U1} = -0.015$, $p = 0.003$). Similarly, the trend of *P. falciparum* showed a downward inflection point in the age group of 50–60 years ($\beta_1 = 0.005$, $\beta_{U1} = -0.003$, $p = 0.010$) (Table 3).

In Belen, Santa Martha is the village with more individuals exposed to *P. vivax* in both recent and historical exposure groups. On the other hand, no exposure has been registered in Mohena Caño individuals for both *Plasmodium* spp. (Fig. 4a). While in Indiana, high levels of seropositivity are observed in Recreo in both recent and historical exposure to *P. vivax*. Otherwise, San Pedro de Manati was the village with non exposed individuals to both, *P. vivax* and *P. falciparum* (Fig. 4b).

Spatial analysis

Spatial autocorrelation analysis was run on the seropositivity rate at recent *P. falciparum* exposure according to the district. In both districts, Belen and Indiana, 90.1% and 97.4% of households did not show significant patterns of high or low malaria seropositivity rate clustered spatially (Fig. 5a and Supplementary Fig. 4).

In contrast, recent *P. vivax* had a completely different result. In Belen, 47.2% of the households were identified as cold spots with a 99% confidence level. Particularly, all households, in 6 of 21 villages, were categorized as cold spots located in the center of the district (Fig. 5b and Supplementary Fig. 4). Additionally, hotspots are identified in 30.1% of the remaining households, most of which are found on the district's edge and are farther from the RHL. In Indiana, the proportions of hot and cold spots are lower. About 20% of the households are categorized as hot spots and are located mainly behind the Amazon River, while about 37% of the remaining households are associated with low or absence of *P. vivax* exposure, being considered as cold spots (Fig. 5b and Supplementary Fig. 4).

For historical exposure, similar results have been found. In Belen and Indiana, 47.6% and 41.9% of the households were identified as hot spots, respectively. For *P. vivax*, 26.5% of households were classified as hot spots and 45.0% as cold spots. *P. falciparum* had similar outcomes, with 18.6% of households being categorized as cold spots and 24.8% as hot spots (Fig. 5c,d).

Discussion

This study makes a valuable contribution to the limited literature on malaria epidemiology in low-transmission settings in the Amazon Region. By analyzing serological markers of *P. vivax* and *P. falciparum*, the study confirmed minimal malaria transmission in the Belen and Indiana districts. However, in long and extreme distance villages, higher seropositivity rate patterns were observed. Furthermore, a pattern of higher seropositivity with increasing age was found for both recent and historical exposure. Additionally, a significant association was identified between seropositivity for *P. vivax* and behavioral malaria risk factors, such as engaging in forest activities and bathing in rivers or countryside. Spatial analysis supported these findings, demonstrating that the hot spots were situated in the most remote regions of both districts.

Variable	<i>Plasmodium Vivax</i>						<i>Plasmodium Falciparum</i>					
	Recent Exposure*			Historical Exposure*			Recent Exposure*			Historical Exposure*		
	Negative, N=3814	Positive, N=186	p	Negative, N=3783	Positive, N=217	p	Negative, N=3981	Positive, N=19	p	Negative, N=3918	Positive, N=82	p
Districts												
Belen	1904 (49.9%)	125 (67.2%)	<0.001	1890 (50.0%)	139 (64.1%)	<0.001	2017 (50.7%)	12 (63.2%)	0.359	1964 (50.1%)	65 (79.3%)	<0.001
Indiana	1910 (50.1%)	61 (32.8%)		1893 (50.0%)	78 (35.9%)		1964 (49.3%)	7 (36.8%)		1954 (49.9%)	17 (20.7%)	
Sex												
Male	1922 (50.4%)	147 (79.0%)	<0.001	1919 (50.7%)	150 (69.1%)	<0.001	2058 (51.7%)	11 (57.9%)	0.651	2018 (51.5%)	51 (62.2%)	0.058
Female	1892 (49.6%)	39 (21.0%)		1864 (49.3%)	67 (30.9%)		1923 (48.3%)	8 (42.1%)		1900 (48.5%)	31 (37.8%)	
Age groups												
(0–10)	1090 (28.7%)	1 (0.5%)	<0.001	1091 (28.9%)	0 (0.0%)	<0.001	1081 (27.2%)	10 (55.6%)	0.289	1086 (27.8%)	5 (6.1%)	<0.001
(10–20)	920 (24.2%)	4 (2.2%)		916 (24.3%)	8 (3.7%)		922 (23.2%)	2 (11.1%)		907 (23.2%)	17 (20.7%)	
(20–30)	367 (9.7%)	13 (7.0%)		370 (9.8%)	10 (4.6%)		378 (9.5%)	2 (11.1%)		374 (9.6%)	6 (7.3%)	
(30–40)	408 (10.7%)	27 (14.6%)		397 (10.5%)	38 (17.5%)		434 (10.9%)	1 (5.6%)		425 (10.9%)	10 (12.2%)	
(40–50)	328 (8.6%)	35 (18.9%)		316 (8.4%)	47 (21.7%)		361 (9.1%)	2 (11.1%)		350 (9.0%)	13 (15.9%)	
(50–60)	305 (8.0%)	41 (22.2%)		308 (8.2%)	38 (17.5%)		346 (8.7%)	0 (0.0%)		332 (8.5%)	14 (17.1%)	
(60–70)	197 (5.2%)	23 (12.4%)		187 (5.0%)	33 (15.2%)		220 (5.5%)	0 (0.0%)		212 (5.4%)	8 (9.8%)	
(70+)	188 (4.9%)	41 (22.2%)	186 (4.9%)	43 (19.8%)	228 (5.7%)	1 (5.6%)	220 (5.6%)	9 (11.0%)				
Economic activities												
None	856 (22.5%)	12 (6.5%)	<0.001	854 (22.6%)	14 (6.5%)	<0.001	861 (21.6%)	7 (36.8%)	0.509	862 (22.0%)	6 (7.4%)	<0.001
Forest related	910 (23.9%)	137 (73.7%)		905 (23.9%)	142 (65.4%)		1042 (26.2%)	5 (26.3%)		1005 (25.7%)	42 (51.9%)	
Trader	101 (2.7%)	3 (1.6%)		101 (2.7%)	3 (1.4%)		103 (2.6%)	1 (5.3%)		101 (2.6%)	3 (3.7%)	
Housewife	648 (17.0%)	25 (13.4%)		632 (16.7%)	41 (18.9%)		671 (16.9%)	2 (10.5%)		659 (16.8%)	14 (17.3%)	
Student	1144 (30.0%)	4 (2.2%)		1140 (30.2%)	8 (3.7%)		1144 (28.8%)	4 (21.1%)		1133 (28.9%)	15 (18.5%)	
Others	152 (4.0%)	5 (2.7%)		148 (3.9%)	9 (4.1%)		157 (3.9%)	0 (0.0%)		156 (4.0%)	1 (1.2%)	
Trip in the last month												
No	3439 (90.2%)	170 (91.4%)	0.875	3423 (90.5%)	186 (85.7%)	0.06	3590 (90.2%)	19 (100.0%)	0.269	3532 (90.2%)	77 (93.9%)	0.463
Yes	365 (9.6%)	16 (8.6%)		350 (9.3%)	31 (14.3%)		381 (9.6%)	0 (0.0%)		376 (9.6%)	5 (6.1%)	
Don't know/ no answer	8 (0.2%)	0 (0.0%)		8 (0.2%)	0 (0.0%)		8 (0.2%)	0 (0.0%)		8 (0.2%)	0 (0.0%)	
Usual places to bathe												
Bathroom inside the dwelling	446 (11.7%)	9 (4.8%)	<0.001	438 (11.6%)	17 (7.8%)	0.017	455 (11.5%)	0 (0.0%)	0.130	447 (11.4%)	8 (9.8%)	0.972
Bathroom outside the dwelling	368 (9.7%)	9 (4.8%)		360 (9.5%)	17 (7.8%)		377 (9.5%)	0 (0.0%)		370 (9.5%)	7 (8.5%)	
In the countryside/ river	2872 (75.5%)	165 (88.7%)		2855 (75.7%)	182 (83.9%)		3019 (76.1%)	18 (94.7%)		2972 (76.1%)	65 (79.3%)	
Other	116 (3.1%)	3 (1.6%)		118 (3.1%)	1 (0.5%)		118 (3.0%)	1 (5.3%)		117 (3.0%)	2 (2.4%)	
Mosquito Net	3769 (99.1%)	186 (100.0%)	0.409	3739 (99.1%)	216 (99.5%)	>0.999	3936 (99.1%)	19 (100.0%)	>0.999	3875 (99.2%)	80 (97.6%)	0.161
Symptoms or signs in the last month												
Fever	347 (9.1%)	30 (16.1%)	0.003	349 (9.2%)	28 (12.9%)	0.093	375 (9.4%)	2 (10.5%)	0.699	364 (9.3%)	13 (15.9%)	0.054
Headache	380 (10.0%)	36 (19.4%)	<0.001	380 (10.0%)	36 (16.6%)	0.004	415 (10.4%)	1 (5.3%)	0.713	399 (10.2%)	17 (20.7%)	0.005
Muscle or joint pain	251 (6.6%)	25 (13.4%)	<0.001	252 (6.7%)	24 (11.1%)	0.018	276 (6.9%)	0 (0.0%)	0.637	267 (6.8%)	9 (11.0%)	0.18
General malaise	247 (6.5%)	25 (13.4%)	<0.001	249 (6.6%)	23 (10.6%)	0.036	272 (6.8%)	0 (0.0%)	0.636	266 (6.8%)	6 (7.3%)	0.823
Self-reported malaria												
No	2786 (73.1%)	32 (17.2%)	<0.001	2786 (73.7%)	32 (14.7%)	<0.001	2805 (70.5%)	13 (68.4%)	0.832	2793 (71.4%)	25 (30.5%)	<0.001
Yes	1000 (26.3%)	150 (80.6%)		968 (25.6%)	182 (83.9%)		1144 (28.8%)	6 (31.6%)		1094 (28.0%)	56 (68.3%)	
Don't know/ no answer	23 (0.6%)	4 (2.2%)		24 (0.6%)	3 (1.4%)		27 (0.7%)	0 (0.0%)		26 (0.7%)	1 (1.2%)	
Distance category to the regional hospital or health facilities												
Proximate distance	1343 (35.2%)	6 (3.2%)	<0.001	1335 (35.3%)	14 (6.5%)	<0.001	1345 (33.8%)	4 (21.1%)	0.605	1338 (34.2%)	11 (13.4%)	<0.001
Medium distance	685 (18.0%)	7 (3.8%)		683 (18.1%)	9 (4.1%)		688 (17.3%)	4 (21.1%)		683 (17.4%)	9 (11.0%)	
Long distance	957 (25.1%)	74 (39.8%)		940 (24.8%)	91 (41.9%)		1026 (25.8%)	5 (26.3%)		1004 (25.6%)	27 (32.9%)	
Extreme distance	829 (21.7%)	99 (53.2%)		825 (21.8%)	103 (47.5%)		922 (23.2%)	6 (31.6%)		893 (22.8%)	35 (42.7%)	

Table 2. Characteristics of study subjects by *Plasmodium* species and types of exposure. Fisher's Exact Test for count data is applied. Continuous data are presented as median (interquartile range) and Mann-Whitney U test. *Some variables could not sum 4000 individuals due to missing data.

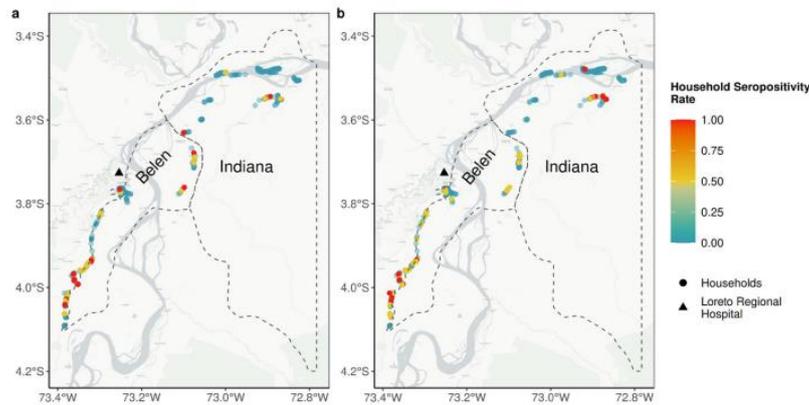


Figure 2. Malaria seropositivity rate by households. Ratio of seropositivity in households for (a) recent exposure and (b) historical exposure across Belen and Indiana districts represented as dashed lines. Points are households and range in color according to seropositivity ratio, with those in red being households with 100% of their members with historical or recent exposure. The Maps were generated with R software v.4.1.2 (R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Austria. <http://www.R-project.org/>).

In other Loreto areas, research on *Plasmodium* spp. seropositivity using serological exposure markers (SEM) has been done. In a cross-sectional study carried out in 2018, high seropositivity rate for *P. vivax* in Iquitos and Mazan was found (38.2% and 56.5%, respectively)⁴². However, SEM use is suggested for regions with low malaria transmission, since it is probably less efficient in regions with high transmission⁴³. Despite yielding zero positive cases through conventional microscopy and qPCR, we were able to ascertain levels of seropositivity. This enabled us to investigate transmission, underscoring the utility of SEM as a useful tool for malaria surveillance in regions characterized by very low transmission rates, particularly in settings where traditional methods such as microscopy, rapid diagnostic tests, or qPCR may lack the sensitivity required to detect low-level infections or asymptomatic cases^{22,44}.

In this study, the villages located in long and extreme distance from their health facilities or the RHL reported higher levels of malaria seropositivity rate than those located in the proximate distance category. Timely access to health facilities for malaria diagnosis and treatment remains an obstacle for people living in remote areas. In 2016, both northern and southern Amazonia were described as having limited accessibility to health services⁷. Exclusively river-based transportation, boat availability, lengthy trip periods, and transportation-related expenditures were some of the obstacles to reaching the most remote study villages. Failure to cover these factors could lead to fragile sustainability of health programs during the malaria elimination phase⁴.

Hot spots of malaria cases are areas where the prevalence of malaria is particularly high⁴⁵. The spatial analysis conducted in this study supported the seropositivity rate pattern observed for both *Plasmodium* species in the Belen and Indiana districts. When stratified by exposure, it was observed that, in both recent and historical exposure, hot spots were located in the most remote areas of the districts. These areas are prone to factors that promote the breeding of *Anopheles* spp. mosquitoes, and conditions that increase the risk of infection⁴⁶. Specifically, malaria hotspots in the study villages may arise due to local variables such as poverty, limited healthcare access, inadequate health infrastructure, travel to high-risk regions, and other preventive measures.

Our study revealed distinct inflection points in age-related seropositivity for *P. vivax* and *P. falciparum* at ages 40–50 and 50–60, respectively. In the context of recurrent exposure to the malaria parasite among older individuals, acquired immunity may play a crucial role in diminishing seroprevalence, potentially leading to a reduction in symptom severity and a decrease in seropositivity for malaria-specific antibodies⁴⁷. Moreover, behavioral and environmental changes in older age groups, such as increased indoor activity and mosquito bed net usage, contributed to reduced exposure to malaria vectors, leading to a decline in seroprevalence. The fluctuations observed within the 40–50 age group can be attributed to a complex interplay of factors, including acquired immunity, changes in exposure, waning immunity, age-related variations in immune responses, and

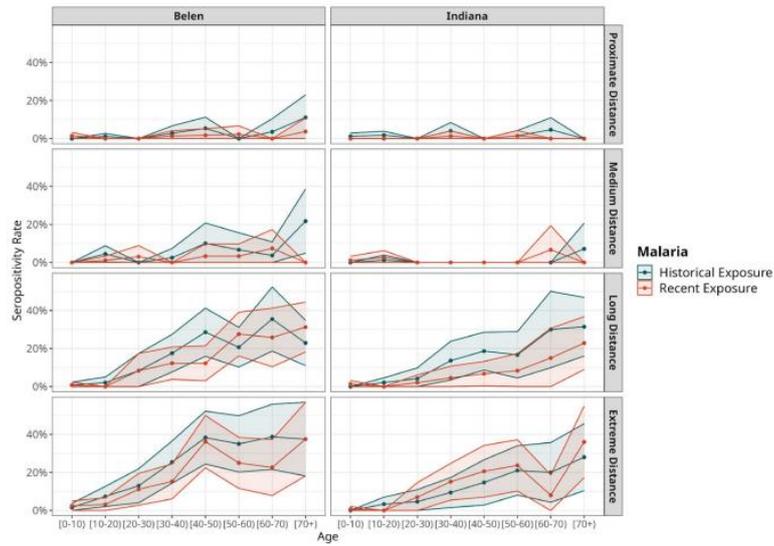


Figure 3. Seropositivity according to time of exposure to malaria by district and distance category of the villages to the Regional Hospital of Loreto (RHL) or their health facilities on a Sampling Basis. Line plot of seropositivity for both types of exposure in the different age groups and categories of distance: proximate, medium, long and extreme distance. The line plots were generated with R software v.4.1.2 (R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Austria. <http://www.R-project.org/>).

	β	SE	t	p	Break-point	Adjusted R ²
<i>P. vivax</i>						
Intercept	-0.06	0.023	-2.628	0.058	40-50	0.946
Age groups	0.043	0.007	6.318	0.003		
U1	-0.015	0.017	-0.882			
<i>P. falciparum</i>						
Intercept	0.008	0.004	2.328	0.08	50-60	0.899
Age groups	0.005	0.001	4.57	0.01		
U1	-0.003	0.003	-1.206			

Table 3. Segmented linear regression model of malaria seropositivity rate by *Plasmodium* species according to age group. U1 shows the change in slope after breakpoint, 40-50 and 50-60 age groups for *P. vivax* and *P. falciparum*, respectively.

demographic and environmental factors. Given the descriptive purpose of the study, a multivariate analysis is needed to uncover the precise causes of age trends.

The COVID-19 pandemic caused disruptions in the delivery of health services, including malaria prevention and treatment interventions. In Peru, there have been delays in the distribution of insecticide-treated bed nets and interruptions in the supply chain of antimalarial drugs, leading to an increase in malaria-related morbidity and mortality²⁷. In the year of study (2021), reported cases were lower than in 2019. This may have been possible due to movement restrictions during the pandemic⁴⁸. However, these restrictions may also have affected access to care, reducing cases reported from health facilities. The study showed that historical exposure frequencies were slightly different from recent exposure, indicating that cases remained stable despite the pandemic in very low transmission areas.

The limitations of this study are related to recall bias, due to the fact that some variables are self-reported. To overcome this bias, the time window of the questions was reduced to one month. Additionally, *P. vivax*

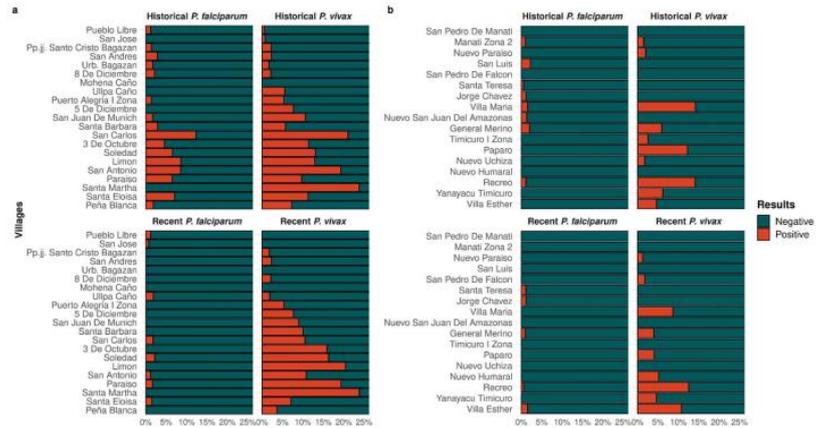


Figure 4. Malaria seropositivity rate by type of exposure and *Plasmodium* species. Bar plot showing malaria serology results according to *Plasmodium* species (*P. falciparum* or *P. vivax*) and time of exposure (recent or historical) in each village for (a) Belen and (b) Indiana. Villages are ordered according to the distance to their health facility or the Regional Hospital of Loreto (RHL). The bar plots were generated with R software v.4.1.2 (R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Austria. <http://www.R-project.org/>).

antigens associated specifically with markers of relapse infection had not yet been identified, limiting the ability to differentiate recent *P. vivax* exposure as novel or relapse infection. Furthermore, not accounting for malaria recrudescence cases in the study may underestimate the ongoing transmission risk, as these cases can contribute to the persistence of the disease in the population. Finally, results from spatial analysis of historical exposure are less definitive. As we define historical exposure as any exposure within the past 20 years, mapping becomes difficult as we cannot tease apart whether exposed individuals are likely to have been exposed within the village they now live, or somewhere else.

In conclusion, the seropositivity rate of *P. vivax* and *P. falciparum* found in Belen and Indiana was consistent with what was expected for areas of very low transmission. In addition, the higher concentration of malaria exposure found in the most remote villages in each district can have important consequences for elimination efforts. These include challenges in accessing and treating affected individuals due to limited resources and infrastructure, and impeding distribution of mosquito nets, indoor residual spraying, and antimalarial medication. Additionally, there is a risk of reintroduction of the disease from neighboring areas with higher transmission rates, even after successful elimination in the region. Thus, ensuring the establishment of effective malaria surveillance and the implementation of malaria control strategies in remote villages can play a crucial role in advancing the efforts towards malaria elimination.

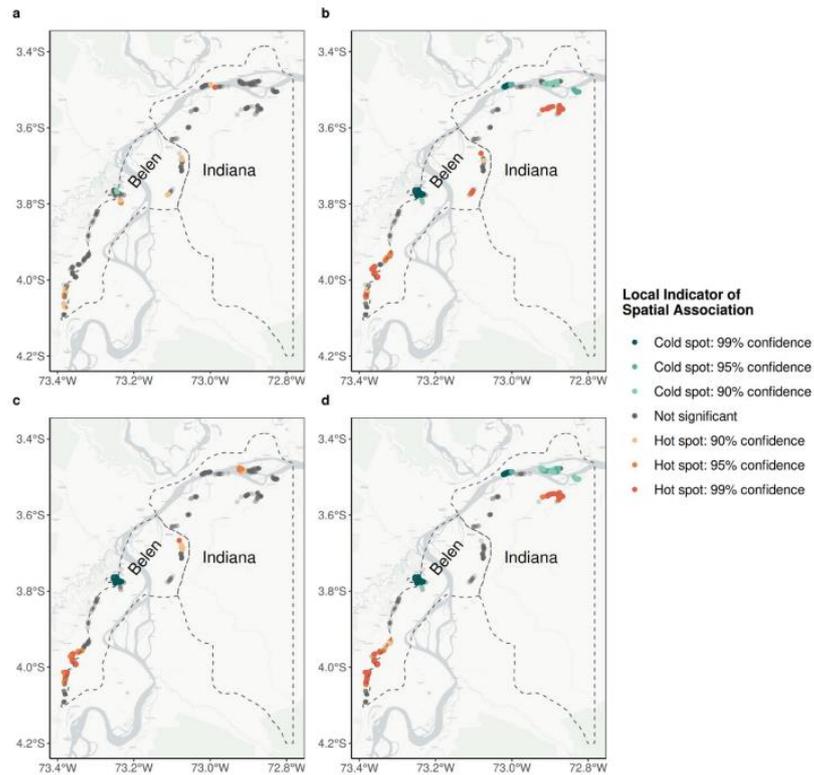


Figure 5. Spatial analysis by type of exposure and *Plasmodium* species. Map showing the locations of households based on the results of the spatial analysis that identifies hot spots and cold spots (with different confidence intervals) for (a) Recent *P. falciparum*, (b) Recent *P. vivax*, (c) Historical *P. falciparum* and (d) Historical *P. vivax*. The Maps were generated with R software v.4.1.2 (R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Austria. <http://www.R-project.org/>).

Data availability

The datasets used in this study to create the maps and perform the spatial analysis will not be available due to ethics considerations. The seropositivity dataset will be available at https://github.com/healthinnovation/ffi_malaria_seropidemiology.

Code availability

Codes to generate tables and figures can be accessed at https://github.com/healthinnovation/ffi_malaria_seropidemiology.

Received: 13 June 2023; Accepted: 16 January 2024
 Published online: 02 February 2024

References

1. World Health Organization. *WHO Global Malaria Programme* <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/elimination> (2023).
2. Lindblade, K. A. *et al.* Supporting countries to achieve their malaria elimination goals: The WHO E-2020 initiative. *Malar. J.* **20**, 481 (2021).
3. World Health Organization. *Global technical Strategy for Malaria 2016–2030, 2021 Update.* (2021).

4. Torres, K. *et al.* Malaria Resilience in South America: Epidemiology, Vector biology, and immunology insights from the Amazonian International Center of Excellence in Malaria Research Network in Peru and Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **107**, 168–181 (2022).
5. World Health Organization. *World Malaria Report 2022*. <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2022> (2022).
6. Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades, MINSA. *Sala Situacional de Malaria en el Perú 2016–2022*.
7. Rosas-Aguirre, A. *et al.* Epidemiology of *Plasmodium vivax* malaria in Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **95**, 133–144 (2016).
8. Ministerio de Salud. *Plan Malaria Cero Periodo 2017–2021*.
9. Krisher, L. K. *et al.* Successful malaria elimination in the Ecuador-Peru border region: Epidemiology and lessons learned. *Malar. J.* **15**, 573 (2016).
10. Ministerio de Salud. *Documento Técnico: Plan Hacia la Eliminación de la Malaria en el Perú 2022–2030* (2022).
11. Saita, S. *et al.* Human population movement and behavioural patterns in malaria hotspots on the Thai-Myanmar border: Implications for malaria elimination. *Malar. J.* **18**, 64 (2019).
12. Chuquiayauri, R. *et al.* Socio-demographics and the development of malaria elimination strategies in the low transmission setting. *Acta Trop.* **121**, 292–302 (2012).
13. Guerra, C. A. *et al.* Human mobility patterns and malaria importation on Bioko Island. *Nat. Commun.* **10**, 2332 (2019).
14. Mousam, A., Maggioni, V., Delamater, P. L. & Quispe, A. M. Using remote sensing and modeling techniques to investigate the annual parasite incidence of malaria in Loreto, Peru. *Adv. Water Resour.* **108**, 423–438 (2017).
15. Alimi, T. O. *et al.* Prospects and recommendations for risk mapping to improve strategies for effective malaria vector control interventions in Latin America. *Malar. J.* **14**, 519 (2015).
16. Robortella, D. R. *et al.* Prospective assessment of malaria infection in a semi-isolated Amazonian indigenous Yanomami community: Transmission heterogeneity and predominance of submicroscopic infection. *PLoS ONE* **15**, e0230643 (2020).
17. Song, L.-G. *et al.* Imported parasitic diseases in mainland China: Current status and perspectives for better control and prevention. *Infect. Dis. Poverty* **7**, 78 (2018).
18. Longley, R. J. *et al.* Development and validation of serological markers for detecting recent *Plasmodium vivax* infection. *Nat. Med.* **26**, 741–749 (2020).
19. Drakeley, C. J. *et al.* Estimating medium- and long-term trends in malaria transmission by using serological markers of malaria exposure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 5108–5113 (2005).
20. Helb, D. A. *et al.* Novel serologic biomarkers provide accurate estimates of recent *Plasmodium falciparum* exposure for individuals and communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E4438–4447 (2015).
21. Longley, R. J. *et al.* IgG antibody responses are preferential compared with IgM for use as serological markers for detecting recent exposure to *Plasmodium vivax* infection. *Open Forum Infect. Dis.* **8**, 228 (2021).
22. Greenhouse, B. *et al.* Priority use cases for antibody-detecting assays of recent malaria exposure as tools to achieve and sustain malaria elimination. *Gates Open Res.* **3**, 131 (2019).
23. Presidencia del Consejo de Ministros. *Información Territorial del Departamento de Loreto*. https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/1895090/Loreto_Informaci%C3%B3n%20Territorial%20Completo.pdf (2021).
24. Dirección General de Seguimiento y Evaluación. *Reporte regional de Indicadores Sociales del Departamento de Loreto*. <https://sdv.mdis.gob.pe/redinforma/Upload/regional/Loreto.pdf> (2023).
25. World Health Organization. *A Framework for Malaria Elimination* (World Health Organization, 2017).
26. Instituto Nacional de Estadística e Informática. *Loreto: Resultados Definitivos de los Censos Nacionales 2017*. https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1561/ (2018).
27. Torres, K. *et al.* Malaria situation in the Peruvian Amazon during the COVID-19 pandemic. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **103**, 1773–1776 (2020).
28. Gutierrez González, S. C. & Arróspide Velasco, N. *Manual de Procedimientos de Laboratorio para el Diagnóstico de Malaria* (2003).
29. Mangold, K. A. *et al.* Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium* spp. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 2435–2440 (2005).
30. Ministerio de Salud. *Norma Técnica de Salud Para la Atención de la Malaria y Malaria grave en el Perú* (2015).
31. Wu, L. *et al.* Optimisation and standardisation of a multiplex immunoassay of diverse *Plasmodium falciparum* antigens to assess changes in malaria transmission using sero-epidemiology. *Wellcome Open Res.* **4**, 26 (2020).
32. Wu, L. *et al.* Antibody responses to a suite of novel serological markers for malaria surveillance demonstrate strong correlation with clinical and parasitological infection across seasons and transmission settings in The Gambia. *BMC Med.* **18**, 304 (2020).
33. Byrne, I. *et al.* Characterizing the spatial distribution of multiple malaria diagnostic endpoints in a low-transmission setting in Lao PDR. *Front. Med.* **9**, 929366 (2022).
34. Chan, Y. L. *et al.* Assessing seroprevalence and associated risk factors for multiple infectious diseases in Sabah, Malaysia using serological multiplex bead assays. *Front. Public Health* **10**, 924316 (2022).
35. Kaufman, L. & Rousseeuw, P. *Finding Groups in Data: An Introduction to Cluster Analysis* (Wiley, 1990). ISBN 0-471-87876-6. <https://doi.org/10.2307/2532178>.
36. Taljaard, M., McKenzie, J. E., Ramsay, C. R. & Grimshaw, J. M. The use of segmented regression in analysing interrupted time series studies: An example in pre-hospital ambulance care. *Implement. Sci.* **9**, 77 (2014).
37. Muggeo, V. M. R. Estimating regression models with unknown break-points. *Stat. Med.* **22**, 3055–3071 (2003).
38. Bivand, R., Altman, M., Anselin, L. & Assunção, R. *spdep: Spatial Dependence: Weighting Schemes, Statistics* (Pion, 2023).
39. Caldas de Castro, M. & Singer, B. H. Controlling the false discovery rate: A new application to account for multiple and dependent tests in local statistics of spatial association. *Geogr. Anal.* **38**, 180–208 (2006).
40. Carrasco-Escobar, G., Fornace, K. & Benmarhnia, T. Mapping socioeconomic inequalities in malaria in Sub-Saharan African countries. *Sci. Rep.* **11**, 15121 (2021).
41. Rossi, F. & Becker, G. Creating forest management units with Hot Spot Analysis (Getis-Ord Gi*) over a forest affected by mixed-severity fires. *Aust. For.* **82**, 166–175 (2019).
42. Rosado, J. *et al.* Malaria transmission structure in the Peruvian Amazon through antibody signatures to *Plasmodium vivax*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **16**, e010415 (2022).
43. Rosado, J. *et al.* Heterogeneity in response to serological exposure markers of recent *Plasmodium vivax* infections in contrasting epidemiological contexts. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **15**, e0009165 (2021).
44. Tayipito, Y., Liu, Z., Mueller, I. & Longley, R. J. Serology for *Plasmodium vivax* surveillance: A novel approach to accelerate towards elimination. *Parasitol. Int.* **87**, 102492 (2022).
45. Sedda, L. *et al.* Hotspots and super-spreaders: Modelling fine-scale malaria parasite transmission using mosquito flight behaviour. *PLoS Pathog.* **18**, e1010622 (2022).
46. Ferreira, M. U. *et al.* Evidence-based malaria control and elimination in the Amazon: Input from the International Center of Excellence in Malaria Research Network in Peru and Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **107**, 160–167 (2022).
47. Ladeia-Andrade, S., Ferreira, M. U., de Carvalho, M. E., Curado, I. & Coura, J. R. Age-dependent acquisition of protective immunity to malaria in riverine populations of the Amazon Basin of Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **80**, 452–459 (2009).
48. Heuschen, A.-K. *et al.* Impact of the COVID-19 pandemic on malaria cases in health facilities in northern Ghana: A retrospective analysis of routine surveillance data. *Malar. J.* **21**, 149 (2022).

Acknowledgements

The research team would like to extend thanks to all the individuals from the 38 villages who participated in this study, to the field team responsible for sample collection and questionnaire administration, and to the Gerencia Regional de Salud Loreto for their support in the field activities of the "Freedom From Infection" project.

Author contributions

L.W., C.D., G.S. and G.C.E. design the study. G.C.E., L.B.A., J.L.B., H.R.F. and V.E.S.C. coordinated the fieldwork. B.F.C., B.P.C. and J.R.C. performed the sampling strategy and data management. B.F.C., B.P.C., M.G.R., J.R.C., A.B.I. and G.C.E. run the statistical analysis. M.H., E.D. and L.G. performed the laboratory experiments. K.T. supervised the laboratory procedures. I.B. performed classification of serology data. B.F.C., B.P.C., M.G.R., I.B. and E.D. wrote the manuscript. A.L.C. and G.C.E. were in charge of the project administration. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This study was funded by the Bill and Melinda Gates Foundation (Grant OPP1177272) awarded to G.S. and C.D. The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-024-52239-5>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to B.F.-C.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2024

II. DISCUSIÓN

El presente estudio proporciona evidencia relevante sobre la exposición reciente a la malaria en entornos amazónicos con muy baja transmisión, específicamente en los distritos de Indiana y Belén, en Loreto, Perú. Utilizando marcadores serológicos y técnicas espaciales, se logró caracterizar los patrones de exposición reciente a *P. falciparum* y *P. vivax*, identificando puntos calientes o *hotspots* claramente delimitados. Estos resultados permiten comprender mejor las dinámicas locales que podrían impedir o retrasar la eliminación definitiva de la malaria en estas zonas. Si bien también se analizaron marcadores de exposición histórica, estos resultados poseen implicancias prácticas más limitadas, dado que tales exposiciones pudieron haber ocurrido previamente en otros lugares o periodos de tiempo, generando incertidumbre sobre su relevancia espacial y temporal. El análisis demostró de forma consistente que, aunque la transmisión generalizada se ha reducido considerablemente gracias a esfuerzos nacionales, la exposición al parásito persiste en focos específicos, particularmente aquellos más alejados de la capital del departamento, revelando una heterogeneidad espacial significativa.

Las variaciones en la seropositividad entre los diferentes grupos de edad indican patrones cambiantes de exposición, posiblemente debido a diferencias en la inmunidad, comportamiento o riesgos ocupacionales (1–3). La relación entre la distancia a los establecimientos de salud y la mayor exposición resalta el papel de la accesibilidad en el control de la malaria, ya que las comunidades más alejadas

son susceptibles a mayores eventos de exposición, lo que destaca la necesidad de intervenciones específicas en estas zonas (4,5).

***Hotspots* de exposición reciente**

La identificación de *hotspots* de exposición reciente representa uno de los principales aportes de este estudio y constituye un insumo crítico para la planificación operativa de intervenciones antimaláricas en contextos de transmisión baja. A diferencia de los marcadores de exposición histórica, los marcadores serológicos utilizados para detectar exposición reciente capturan infecciones ocurridas durante los últimos 6 a 12 meses (6). Este aspecto es especialmente relevante en contextos como el de Loreto, donde los registros clínicos y parasitológicos subestiman la circulación del parásito debido al alto número de infecciones subclínicas o asintomáticas (7).

Nuestros hallazgos mostraron tasas elevadas de seropositividad reciente, particularmente para *P. vivax*, superiores al 20% en comunidades específicas, especialmente en aquellas ubicadas más lejos de los centros de salud principales. Estas observaciones resaltan la necesidad urgente de mantener y posiblemente intensificar las intervenciones dirigidas en estas zonas específicas, incluso si están clasificadas como de baja transmisión según criterios clínicos o parasitológicos tradicionales. Estas clasificaciones no suelen capturar infecciones subclínicas o de baja parasitemia, lo cual enfatiza la importancia de los hallazgos serológicos recientes para una vigilancia epidemiológica más sensible y precisa (8,9).

Estas áreas, identificadas como *hotspots* mediante técnicas de estadística espacial local (Getis-Ord G_i^*), concentran individuos recientemente expuestos y por tanto deben considerarse como puntos prioritarios para intervenciones de control, vigilancia intensificada y diagnóstico temprano. Además, el carácter focal de estos *hotspots* recientes sugiere que la transmisión residual en contextos de baja endemividad no es homogénea, sino que se agrupa en territorios específicos y frecuentemente invisibilizados por sistemas de vigilancia tradicionales (10,11).

Resultados derivados del modelo multinivel

Los modelos multinivel de regresión de Poisson ajustados en este estudio aportan evidencia adicional sobre factores individuales y estructurales asociados específicamente a la exposición reciente. Las distancias lejanas y extremas a centros de salud emergieron como factores significativos para exposición reciente a *P. vivax*, fortaleciendo la interpretación espacial obtenida mediante *hotspots* y confirmando que ciertos grupos poblacionales y comunidades específicas se encuentran bajo un riesgo diferencial significativo. En contraste, la exposición reciente a *P. falciparum* mostró resultados menos concluyentes, con ninguna asociación estadística clara probablemente debido al bajo número de casos positivos, sugiriendo una distribución más homogénea y menos focalizada del riesgo en esta especie particular.

Significado clínico de la regresión lineal segmentada

El análisis de la regresión lineal segmentada aporta un valor clínico y epidemiológico adicional al identificar puntos de quiebre en la relación entre edad

y seropositividad, lo cual refleja transiciones biológicas y conductuales u ocupacionales en la exposición a malaria. En el caso de *P. vivax*, la reducción en la seropositividad observada entre los 40 y 50 años puede interpretarse como el resultado combinado de varios procesos. Por un lado, la consolidación de la inmunidad adquirida tras años de exposición repetida, que disminuye la probabilidad de nuevas infecciones detectables (12,13), y por otro, posibles cambios en los patrones ocupacionales y sociales de este grupo etario (14), quienes podrían participar con menor frecuencia en actividades de mayor riesgo (viajes prolongados para actividades relacionadas con el bosque), en comparación con adultos más jóvenes, aunque mantengan ocupaciones agrícolas con riesgo intermitente. Para *P. falciparum*, el cambio identificado hacia los 50 y 60 años podría reflejar tanto una declinación progresiva de la inmunidad protectora con la edad, como la persistencia de exposiciones ocupacionales en subgrupos de adultos que continúan desempeñando actividades en áreas de transmisión residual (15). Adicionalmente, estos hallazgos sugieren que los puntos de inflexión por edad no deben interpretarse únicamente como eventos inmunológicos, sino también como el reflejo de variaciones en los patrones de riesgo vinculados a ocupación, movilidad y roles comunitarios (16–18). En consecuencia, la regresión segmentada no solo identifica transiciones estadísticas, sino que también orienta la focalización de intervenciones diferenciadas. Por ejemplo, prevención y detección temprana en grupos jóvenes, consolidación de medidas de protección en adultos en edad productiva y estrategias específicas de vigilancia en adultos mayores, en quienes la inmunidad puede disminuir y el riesgo clínico aumentar.

Contexto sociodemográfico de los hallazgos

Las diferencias sociodemográficas y geográficas entre Indiana y Belén pueden haber influenciado los patrones de exposición observados en el estudio. Indiana es un distrito caracterizado por ser rural (62% de la población) con menor nivel educativo y comunidades de difícil acceso, generalmente por vía fluvial. En contraste, Belén, cuenta con una mayor cantidad de población ubicada en zonas urbanas (87.6%), mejor escolaridad promedio y conexión cercana a Iquitos por carretera o río (19). Consecuentemente, la población de la zona urbana central de Belén tuvo una exposición baja a malaria, mientras que la transmisión residual se concentró en comunidades periféricas y rurales de ambos distritos. Aproximadamente el 50% de los hogares muestreados en Belén se identificaron como *coldspots* o puntos fríos y se ubicaron en la zona céntrica, mientras que los *hotspots* de exposición reciente se localizaron hacia los bordes más alejados del distrito. En Indiana, al ser más rural y disperso, una proporción menor de hogares estuvo libre de la exposición (37% de hogares clasificados como *coldspots*) y se detectaron *hotspots* en las áreas más aisladas tras el río Amazonas.

Por otro lado, las diferencias entre los patrones espaciales de *P. falciparum* y *P. vivax* sugieren la influencia de factores no medidos. La exposición serológica a *P. falciparum* resultó mucho más reducida que la de *P. vivax* (2.5% vs 7.8%). En nuestros análisis, factores como el cuartil de distancia y actividades forestales explicaron menos la variabilidad de *P. falciparum*. Esto indica que la movilidad poblacional podría estar desempeñando un papel importante en la transmisión local de *P. falciparum*. Estudios en Loreto han señalado que más del 85% de los casos de malaria en Perú ocurren allí y que la movilidad interna, principalmente

por motivos ocupacionales, es responsable de mantener la endemidad y reintroducir parásitos en áreas receptoras (16). Por ejemplo, se ha encontrado que ser varón, trabajar al aire libre y viajar a campamentos rurales por trabajo se asocia con mayor probabilidad de infección por malaria en individuos móviles (16). Un estudio de modelamiento estimó que eliminar las actividades laborales fuera de la comunidad reduciría en alrededor de 22 puntos porcentuales la seroprevalencia de malaria reciente, y destacó que los hombres adultos que trabajan temporalmente lejos de sus comunidades rurales aportan desproporcionadamente a la transmisión residual (15). En conjunto, estos hallazgos sugieren que algunos *hotspots* de exposición a malaria reciente identificados podrían deberse a infecciones importadas o movilización de personas hacia zonas endémicas.

Relevancia para el contexto de la malaria en el Perú

Durante las últimas décadas, el Perú ha venido realizando acciones importantes en la lucha contra la malaria, obteniendo reducciones significativas en su incidencia general, especialmente en la Amazonía, donde se concentra la mayoría de casos reportados a nivel nacional, teniendo como epicentro de la enfermedad al departamento de Loreto (20). A pesar del éxito de programas como PAMAFRO (Control de la malaria en zonas fronterizas de la región Andina), implementado entre 2006 y 2010, y posteriormente el Plan Malaria Cero (2017-2021), los resultados evidenciaron que al interrumpirse estas acciones, el número de casos vuelve a incrementar (21,22). Esta fragilidad en los logros obtenidos subraya la importancia de estrategias sostenibles ajustadas a contextos locales específicos. Por lo tanto, es crucial considerar métodos de vigilancia alternativos que puedan

descubrir patrones de transmisión que los sistemas de vigilancia epidemiológica tradicionales no logran identificar.

En particular, la medición de la exposición a la malaria mediante pruebas serológicas presenta ventajas significativas en contextos de baja transmisión, dado que las técnicas convencionales de detección parasitaria suelen identificar solo un número reducido de individuos con infecciones activas debido a las bajas densidades parasitarias características de estas áreas. Las pruebas serológicas, en cambio, permiten detectar individuos expuestos al parásito en periodos del pasado (9), ofreciendo así una visión integral del historial de exposición. En este contexto, nuestros hallazgos, que evidencian una seroprevalencia reciente superior al 20% en determinadas comunidades, se alinean con estudios previos realizados en el ámbito local (23) y resaltan la importancia de implementar estrategias oportunas de tamizaje y diagnóstico temprano, incluso en contextos de baja transmisión.

Implicancia de los hallazgos en políticas públicas de salud en Perú

En ese contexto, los resultados de este estudio aportan evidencia relevante para la revisión y el fortalecimiento del *Plan Nacional hacia la Eliminación de la Malaria en el Perú 2022-2030*, aprobado por el Ministerio de Salud (MINSA). Dicho plan establece como objetivos la reducción en un 90% de los casos para el año 2030 (24). Las tasas de seropositividad observadas en este análisis, aún en un escenario de transmisión globalmente baja, destacan la necesidad de mantener una vigilancia epidemiológica continua incluso en regiones clasificadas como de menor riesgo de transmisión (25–27). Esta vigilancia sostenida es importante para la detección

oportuna de zonas emergentes o focos residuales que podrían comprometer el logro de las metas nacionales de eliminación. Precisamente, en este estudio se evidenció que las comunidades más alejadas de la capital presentaron tasas más altas de seropositividad frente a ambas especies de *Plasmodium* y en ambos tipos de exposición (reciente e histórica), lo cual subraya la necesidad de ajustar las estrategias de eliminación vigentes para garantizar la efectividad del plan nacional de eliminación.

Además, este estudio resalta el papel determinante de la accesibilidad a los servicios de salud en la exposición a la malaria. Las regiones amazónicas, caracterizadas por grandes distancias de viaje, aislamiento geográfico y limitadas opciones de transporte (28), presentan desafíos estructurales que afectan la capacidad de respuesta ante la enfermedad. Las comunidades más remotas evidenciaron mayores niveles de exposición, lo que enfatiza la necesidad de priorizar la accesibilidad como componente clave en las políticas públicas. En consecuencia, los responsables de la formulación de políticas y los tomadores de decisiones pueden utilizar estos hallazgos para ajustar las estrategias de eliminación de la malaria mediante enfoques más focalizados y contextualmente pertinentes. Por ejemplo, las áreas identificadas como *hotspots* pueden requerir intervenciones intensificadas, tales como un incremento en la frecuencia de medidas de control vectorial, el fortalecimiento de la infraestructura sanitaria local y la implementación de programas comunitarios que promuevan activamente la búsqueda oportuna de atención médica (29–31).

La identificación de puntos críticos de seropositividad, así como de subpoblaciones vulnerables en zonas de baja transmisión, permite optimizar la asignación de recursos y focalizar las intervenciones a las áreas más afectadas (31,32). En este tipo de contextos, los casos tienden a concentrarse geográficamente, lo que resalta la importancia de traducir estos hallazgos en estrategias que fortalezcan el sistema de vigilancia epidemiológica. Tal sistema debe evolucionar hacia una herramienta operativa esencial, capaz de identificar agrupamientos de casos, caracterizarlos adecuadamente y permitir la eliminación focalizada de las infecciones (33,34).

Adicionalmente, la expansión de la infraestructura sanitaria en zonas remotas, ya sea mediante la construcción de nuevas instalaciones o el fortalecimiento de la capacidad operativa de las ya existentes, puede reducir significativamente el tiempo y la distancia requeridos para acceder a servicios médicos (35–37). Este factor es fundamental para garantizar diagnósticos y tratamientos oportunos, los cuales son determinantes clave en la interrupción de la cadena de transmisión de la malaria (38,39).

De la misma forma, la participación activa de las comunidades en las iniciativas de control y eliminación de la malaria, a través de actividades de educación, vigilancia participativa y prevención puede contribuir sustancialmente a mejorar los resultados en salud (40–42). En este contexto, los agentes comunitarios de salud (ACS) desempeñan un papel estratégico, al facilitar el acceso a la atención médica y actuar como difusores de información clave en sus respectivas

comunidades. Diversas experiencias han mostrado que la incorporación efectiva de ACS en programas antimaláricos fortalece la detección temprana de casos febriles, mejora el acceso oportuno a tratamientos, incrementa la adherencia a intervenciones preventivas y favorece la vigilancia epidemiológica comunitaria, aspectos importantes para avanzar hacia la eliminación de la enfermedad (43–45).

Finalmente, la integración de las acciones de vigilancia y tratamiento de la malaria con otros servicios de salud podría permitir una utilización más eficiente de los recursos disponibles, además de potenciar los beneficios en términos de salud pública. Por ejemplo, las actividades de tamizaje para malaria podrían articularse con chequeos médicos rutinarios u otros programas de control de enfermedades, promoviendo así un enfoque integral y sinérgico en la atención primaria.

Uso de métodos espaciales y muestreo estratificado

Desde una perspectiva metodológica, este estudio aportó significativamente al utilizar un diseño de muestreo estratificado que integró factores espaciales y sociodemográficos. El empleo de herramientas propias de la epidemiología espacial fue fundamental para describir con precisión la distribución de la exposición a la malaria, así como para identificar agrupaciones locales de alta y baja seropositividad. La epidemiología espacial facilita la visualización y el análisis de patrones geográficos complejos, revelando información clave que podría pasar inadvertida al utilizar únicamente métodos epidemiológicos tradicionales (46–48).

Específicamente, la aplicación del análisis espacial mediante la estadística Getis-Ord G_i^* permitió identificar patrones locales de transmisión (49,50), lo cual facilita el diseño de intervenciones dirigidas. Esta técnica presenta diversas ventajas, destacando la precisión con la que se detectan áreas específicas de alto (*hotspots*) y bajo riesgo (*coldspots*). Esto permite que las autoridades sanitarias dirijan sus esfuerzos y recursos hacia aquellas zonas en las que las intervenciones son más necesarias, asegurando así un uso más eficiente y focalizado de los recursos disponibles. Comparada con otras técnicas de autocorrelación espacial local, como el índice de Moran I local, el estadístico Getis-Ord G_i^* tiene la particularidad de identificar específicamente conglomerados espaciales con valores significativamente altos o bajos, proporcionando información detallada acerca de los patrones locales en diferentes escalas geográficas. Otra ventaja adicional del Getis-Ord G_i^* es su flexibilidad estadística, ya que no requiere estrictamente que los datos cumplan con supuestos de normalidad debido al uso de una distribución de referencia generada por permutaciones aleatorias (51). Asimismo, esta metodología destaca por su facilidad interpretativa, ya que presenta directamente valores Z acompañados de niveles claros de significancia estadística (p-valor), permitiendo una identificación rápida y precisa de patrones espaciales no aleatorios (52).

La epidemiología espacial también contribuye significativamente revelando patrones influenciados por factores ambientales, comportamientos humanos o la ecología del vector (53–55). Dicho entendimiento resulta crucial para diseñar estrategias efectivas de control y evaluar la eficacia de las intervenciones a lo largo

del tiempo. Por ejemplo, la identificación precisa de *hotspots* con alta exposición a la malaria permite dirigir recursos y acciones sanitarias hacia estas zonas prioritarias. Además, el conocimiento detallado sobre la distribución espacial puede facilitar la evaluación del riesgo de resurgimiento de la enfermedad y favorecer una planificación adecuada para respuestas rápidas en áreas potencialmente vulnerables en el futuro (56,57).

Por otro lado, el muestreo estratificado constituyó otro aspecto clave del diseño metodológico de este estudio. Al considerar la distancia geográfica respecto al Hospital Regional de Loreto, esta estrategia aseguró una representación adecuada de la población en diferentes niveles de accesibilidad a servicios de salud, permitiendo capturar con precisión variaciones en la exposición a la malaria asociadas con factores geográficos y sociodemográficos. La división en cuartiles según distancia permitió extraer conclusiones específicas sobre la relación entre accesibilidad sanitaria y exposición a la enfermedad. El muestreo estratificado garantizó así una representación equilibrada de diferentes subgrupos poblacionales, contribuyendo a obtener resultados más generalizables y robustos (58,59).

La integración de la epidemiología espacial y el muestreo estratificado permitió aumentar la calidad y fiabilidad de los datos recopilados, generando conclusiones más sólidas y recomendaciones mejor fundamentadas (46,60). Además, esta combinación metodológica facilita el desarrollo de intervenciones específicas que responden directamente a las necesidades particulares de diversas subpoblaciones,

proporcionando a los tomadores de decisiones información precisa y accionable para formular e implementar estrategias eficaces orientadas al control y eventual eliminación de la malaria.

Desafíos para el control de la malaria

Uno de los principales desafíos identificados en este estudio radica en la elevada seroprevalencia de malaria en entornos caracterizados por una baja transmisión, lo cual constituye una barrera significativa para alcanzar los objetivos de eliminación de esta enfermedad. Este fenómeno plantea interrogantes importantes que requieren una investigación más profunda, tales como determinar si una alta seroprevalencia en contextos de transmisión baja es un patrón común en otras regiones donde también se implementan programas orientados hacia la eliminación de la malaria. En este sentido, el presente estudio proporciona una aproximación inicial al describir e identificar las características específicas de estas poblaciones, aportando conocimientos que constituyen una base para el planteamiento de nuevas hipótesis y futuras líneas de investigación.

Un desafío adicional lo representan los individuos portadores asintomáticos, quienes pueden desempeñar un papel clave en el mantenimiento de altos niveles de seroprevalencia, dado que generalmente no buscan tratamiento y continúan participando de manera silenciosa en la transmisión del parásito (61,62). Este problema se ve agravado por la limitada disponibilidad de recursos económicos y logísticos, situación especialmente crítica en países de bajos y medianos ingresos, lo cual compromete la sostenibilidad de los programas nacionales para la

eliminación de la malaria. Además, las barreras geográficas imponen importantes desafíos logísticos para la provisión adecuada de servicios sanitarios, la ejecución de actividades de vigilancia epidemiológica y la implementación efectiva de medidas de control.

Por otro lado, la alta movilidad humana propia de las comunidades amazónicas constituye otro riesgo relevante identificado. La frecuencia con la que estas poblaciones se desplazan hacia áreas con transmisión moderada o alta podría favorecer la reintroducción periódica del parásito en zonas de transmisión baja, dificultando así los esfuerzos de eliminación definitiva (63).

Limitaciones del Estudio

Las limitaciones principales del estudio se relacionan inicialmente con un potencial sesgo de memoria, dado que algunas variables recogidas provienen directamente de reportes proporcionados por los propios participantes. Este sesgo pudo haberse amplificado especialmente en comunidades amazónicas peruanas, donde el acceso oportuno a diagnósticos confirmatorios y la percepción local sobre síntomas específicos pueden variar. Para mitigar parcialmente este problema, el cuestionario limitó la indagación a eventos ocurridos únicamente en el último mes.

Por otra parte, aún no se han identificado antígenos específicos del parásito *P. vivax* asociados claramente a infecciones recurrentes (recaídas). Esta situación limita la capacidad del estudio para distinguir si una infección reciente corresponde a una exposición inicial o es una reactivación latente, aspecto especialmente crítico

en la Amazonía peruana, donde las recaídas por *P. vivax* son frecuentes y pueden confundirse fácilmente con nuevas exposiciones al vector. Para abordar esta limitación en futuros estudios, sería clave desarrollar investigaciones centradas en la identificación y validación de marcadores serológicos específicos de recaídas por *P. vivax*, particularmente en la Amazonía peruana. Esto podría realizarse mediante estudios longitudinales con cohortes bien definidas, en las cuales se realice un seguimiento de individuos infectados con este *Plasmodium*, analizando patrones inmunológicos y antigénicos que permitan diferenciar claramente una infección nueva de una recaída.

Una limitación metodológica se relaciona con el cuestionario empleado para la recolección de datos. Si bien fue traducido, adaptado y piloteado en campo antes de su aplicación definitiva, no se realizó una validación formal mediante pruebas de concordancia, confiabilidad interna o análisis psicométricos estructurados. Esta omisión es especialmente relevante para variables sujetas a interpretación subjetiva o conocimiento previo del encuestado, como el autorreporte de episodios febriles o el uso habitual de mosquiteros, lo que podría haber introducido cierto grado de sesgo en los modelos. Para futuros estudios se recomienda la implementación de evaluaciones formales como pruebas piloto con mediciones repetidas, análisis de alfa de Cronbach o pruebas de validez de contenido y consistencia interobservador.

Desde el punto de vista estadístico, otra limitación importante fue la baja frecuencia de exposición reciente a malaria, particularmente a *P. falciparum*, lo

cual limitó la detección de asociaciones con covariables poco frecuentes. Aunque el tamaño muestral total fue amplio, la escasez de eventos positivos en algunas combinaciones de variables generó intervalos de confianza amplios y modelos que no siempre convergieron, como ocurrió al intentar aplicar una regresión lineal segmentada ajustada por covariables. Esta técnica fue utilizada para evaluar puntos de inflexión en la exposición por grupos etarios; sin embargo, debido a la limitada cantidad de casos positivos en edades específicas, no fue posible incorporar términos de ajuste adicionales sin comprometer la estabilidad del modelo. Adicionalmente, el coeficiente de correlación intraclase para ambas exposiciones a *P. falciparum* fue de 0.038. Este valor debe interpretarse con cautela debido a la baja prevalencia del desenlace (2.5%) en la muestra evaluada. En contextos con eventos poco frecuentes, es común que el ICC subestime el verdadero grado de agrupamiento (64). Además, dado que el diseño del estudio presenta una estructura jerárquica clara, resulta metodológicamente apropiado mantener un enfoque de modelado multinivel.

Asimismo, la imposibilidad de construir un modelo multivariado ajustado para la exposición reciente a *P. falciparum* constituye una limitación relevante de este estudio, con implicancias en distintos niveles. Desde el punto de vista metodológico, la ausencia de covariables significativas en el análisis bivariado y la falta de convergencia en modelos alternativos reflejan las dificultades de trabajar en contextos de muy baja transmisión, donde la escasez de eventos puede limitar la capacidad de identificar asociaciones (65). Desde la perspectiva epidemiológica, esta limitación también evidencia la heterogeneidad en la transmisión de las

especies de *Plasmodium* en la Amazonía peruana (66). Mientras que *P. vivax* presentó suficiente número de casos para analizar patrones diferenciales de exposición, *P. falciparum* se mantuvo en niveles residuales, lo que puede ser interpretado como un indicio positivo hacia la eliminación, pero que al mismo tiempo dificulta la comprensión de los determinantes locales de su persistencia. La falta de modelos ajustados impide, por ejemplo, precisar si la exposición a *P. falciparum* se concentra en subpoblaciones móviles, en áreas de difícil acceso o en grupos ocupacionales específicos, información clave para focalizar intervenciones.

Adicionalmente, la interpretación espacial del análisis histórico de exposición presentó limitaciones adicionales. La definición utilizada para la exposición histórica abarcó hasta 20 años previos, dificultando precisar si dicha exposición ocurrió efectivamente en la localidad actual del participante o si sucedió en otra región. Esto adquiere especial relevancia en el contexto peruano, donde existe alta movilidad poblacional en la Amazonía debido a actividades económicas, desplazamientos laborales y migración interna. Estudios futuros, deberían incluir información detallada sobre el historial migratorio y residencias anteriores de los participantes, además de precisar la duración aproximada de permanencia en cada localidad. Esto permitiría una mejor asignación geográfica de la exposición histórica y facilitaría una interpretación más precisa y fiable de los resultados epidemiológicos.

Finalmente, la generalización de los hallazgos de este estudio debe considerarse con cautela, dado que la recolección de datos se realizó durante la pandemia de COVID-19. Este periodo estuvo caracterizado por alteraciones en los servicios de salud, incluyendo retrasos en la distribución de mosquiteros tratados con insecticida e interrupciones en la cadena de suministro de medicamentos antimaláricos (67). Además, las restricciones de movilidad pudieron limitar tanto la exposición al vector en algunas comunidades como el acceso oportuno a los establecimientos de salud en otras, generando un escenario atípico respecto a los patrones habituales de transmisión y reporte (68). En consecuencia, aunque los resultados reflejan la situación de muy baja transmisión en 2021, su extrapolación a periodos previos o posteriores debe hacerse con prudencia, ya que, las dinámicas observadas podrían no ser representativas de contextos sin las restricciones o escenarios impuestos por la pandemia.

Conclusión

En conclusión, aunque Perú ha avanzado considerablemente hacia la eliminación de la malaria, persisten focos residuales de alta exposición a malaria en zonas clasificadas como de baja transmisión que requieren intervenciones focalizadas, sostenidas y adaptadas al contexto local. La presencia de *hotspots* de exposición reciente en las comunidades más alejadas de la capital evidencia la importancia de considerar la accesibilidad a los servicios de salud como un factor clave en la transmisión. Por ello, es necesario rediseñar estrategias orientadas a reducir la transmisión y asegurar el camino hacia la eliminación sostenible de la malaria.

Recomendaciones

A corto plazo,

- Fomentar la participación activa de las comunidades en las iniciativas de control y eliminación de la malaria, a través de actividades de educación, vigilancia participativa y prevención puede contribuir sustancialmente a mejorar los resultados en salud.
- Priorizar intervenciones focalizadas (entrega de mosquiteros, campañas educativas, tamizaje) en las comunidades identificadas como *hotspots*.
- Reactivar o reforzar brigadas móviles en zonas de difícil acceso para diagnóstico oportuno y seguimiento serológico.
- Establecer alianzas rápidas con universidades o laboratorios cercanos para procesar muestras serológicas mientras se desarrollan capacidades locales.

A largo plazo,

- Implementar un sistema de vigilancia epidemiológica que use pruebas serológicas como complemento esencial a los métodos diagnósticos actualmente utilizados, con el fin de monitorear con mayor precisión las tendencias de exposición a la malaria en la población (9). Esto implicaría una inversión estratégica en infraestructura de laboratorio, adquisición e implementación de pruebas serológicas confiables, y formación especializada del personal sanitario encargado del diagnóstico y análisis.

- Promover investigaciones orientadas al desarrollo de pruebas serológicas tipo *point-of-care*, que no dependan de una infraestructura laboratorial compleja, permitiendo así obtener resultados inmediatos y confiables directamente en campo.
- Mejorar la infraestructura sanitaria en áreas remotas para garantizar un acceso oportuno al diagnóstico y tratamiento adecuado de la malaria. Este estudio evidencia una disparidad espacial significativa en la seroprevalencia de malaria, siendo particularmente elevada en aquellas comunidades ubicadas más lejos del Hospital Regional de Loreto. Esta situación demanda acciones concretas como la construcción de nuevos establecimientos de salud, el fortalecimiento operativo y estructural de las instalaciones existentes, y la incorporación de unidades de salud móviles destinadas específicamente a brindar servicios médicos en comunidades aisladas (69). Paralelamente, la mejora en infraestructura de transporte y comunicación resulta indispensable para facilitar el acceso oportuno a los servicios médicos en dichas zonas (70).
- Fortalecer los sistemas de vigilancia epidemiológica para recopilar datos detallados, precisos y oportunos sobre los casos de malaria es esencial para el éxito de los programas de eliminación. Esto incluye la integración de tecnologías avanzadas, tales como sistemas de información geográfica y herramientas digitales de recopilación de datos mediante dispositivos

móviles, las cuales permiten mejorar sustancialmente la exactitud, eficiencia y rapidez en la obtención y análisis de la información epidemiológica (71,72). En consecuencia, se recomienda que los gobiernos prioricen el desarrollo e implementación de herramientas tecnológicas modernas de vigilancia, estableciendo colaboraciones estratégicas con proveedores tecnológicos e instituciones académicas o de investigación, para maximizar la efectividad y sostenibilidad de dichos sistemas.

- Desarrollar estrategias tecnológicas y de seguimiento longitudinal para mejorar la medición de la movilidad humana. Dado que la cobertura arbórea en la Amazonía peruana limita la precisión de dispositivos GPS convencionales y el uso de datos de telefonía móvil, se recomienda el desarrollo e implementación de dispositivos GPS optimizados para entornos selváticos, con mayor sensibilidad de recepción satelital y reducción de errores de localización (73). Estas herramientas deberían integrarse en diseños de estudio longitudinal, conformando cohortes de seguimiento compuestas por personas sin infección activa al inicio, a quienes se les pueda entregar estos dispositivos para registrar patrones reales de movilización diaria, estacional o laboral (63). Este enfoque permitiría correlacionar trayectorias geográficas con datos serológicos o parasitológicos repetidos a lo largo del tiempo, lo que ofrecería una visión más precisa sobre la relación entre movilidad humana y riesgo de exposición a *Plasmodium* spp. Asimismo, esta estrategia sería especialmente útil para identificar rutas críticas de transmisión o zonas de

riesgo importado que escapan a los métodos de vigilancia estáticos tradicionales.

III. REFERENCIAS

1. Ashton RA, Joseph V, Hoogen LL van den, Tetteh KKA, Stresman G, Worges M, et al. Risk Factors for Malaria Infection and Seropositivity in the Elimination Area of Grand'Anse, Haiti: A Case–Control Study among Febrile Individuals Seeking Treatment at Public Health Facilities. 2020 May 26 [cited 2025 Mar 20]; Available from: <https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/103/2/article-p767.xml>
2. Dinsa DW, Keno TD, Deressa CT. A systematic review of age-structured malaria transmission models (2019–2024). *Front Appl Math Stat* [Internet]. 2024 Dec 18 [cited 2025 Mar 20];10. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/applied-mathematics-and-statistics/articles/10.3389/fams.2024.1512390/full>
3. Shelton JMG, Corran P, Risley P, Silva N, Hubbart C, Jeffreys A, et al. Genetic determinants of anti-malarial acquired immunity in a large multi-centre study. *Malar J*. 2015 Aug 28;14(1):333.
4. Galindo MS, Lambert Y, Mutricy L, Garancher L, Miller JB, Gomes JH, et al. Implementation of a novel malaria management strategy based on self-testing and self-treatment in remote areas in the Amazon (Malakit): confronting a-priori assumptions with reality. *BMC Public Health*. 2022 Apr 15;22(1):770.
5. McLean ARD, Wai HP, Thu AM, Khant ZS, Indrasuta C, Ashley EA, et al. Malaria elimination in remote communities requires integration of malaria control activities into general health care: an observational study and interrupted time series analysis in Myanmar. *BMC Med*. 2018 Oct

22;16(1):183.

6. Wu L, Mwesigwa J, Affara M, Bah M, Correa S, Hall T, et al. Antibody responses to a suite of novel serological markers for malaria surveillance demonstrate strong correlation with clinical and parasitological infection across seasons and transmission settings in The Gambia. *BMC Med.* 2020 Sep 25;18(1):304.
7. Janko MM, Recalde-Coronel GC, Damasceno CP, Salmón-Mulanovich G, Barbieri AF, Lescano AG, et al. The impact of sustained malaria control in the Loreto region of Peru: a retrospective, observational, spatially-varying interrupted time series analysis of the PAMAFRO program. *Lancet Reg Health - Am.* 2023 Mar 16;20:100477.
8. Longley RJ, White MT, Takashima E, Brewster J, Morita M, Harbers M, et al. Development and validation of serological markers for detecting recent *Plasmodium vivax* infection. *Nat Med.* 2020 May;26(5):741–9.
9. Greenhouse B, Daily J, Guinovart C, Goncalves B, Beeson J, Bell D, et al. Priority use cases for antibody-detecting assays of recent malaria exposure as tools to achieve and sustain malaria elimination. *Gates Open Res.* 2019;3:131.
10. Sturrock HJW, Hsiang MS, Cohen JM, Smith DL, Greenhouse B, Bousema T, et al. Targeting Asymptomatic Malaria Infections: Active Surveillance in Control and Elimination. *PLoS Med.* 2013 Jun 18;10(6):e1001467.
11. Cook J, Speybroeck N, Sochantanta T, Somony H, Sokny M, Claes F, et al. Sero-epidemiological evaluation of changes in *Plasmodium falciparum* and

- Plasmodium vivax* transmission patterns over the rainy season in Cambodia. *Malar J.* 2012 Mar 25;11(1):86.
12. Greenhouse B, Ho B, Hubbard A, Njama-Meya D, Narum DL, Lanar DE, et al. Antibodies to *Plasmodium falciparum* antigens predict a higher risk of malaria but protection from symptoms once parasitemic. *J Infect Dis.* 2011 Jul 1;204(1):19–26.
 13. Simmons RA, Mboera L, Miranda ML, Morris A, Stresman G, Turner EL, et al. A longitudinal cohort study of malaria exposure and changing serostatus in a malaria endemic area of rural Tanzania. *Malar J.* 2017 Aug 2;16:309.
 14. Ladeia-Andrade S, Ferreira MU, de Carvalho ME, Curado I, Coura JR. Age-dependent acquisition of protective immunity to malaria in riverine populations of the Amazon Basin of Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2009 Mar;80(3):452–9.
 15. Carrasco-Escobar G, Rosado J, Nolasco O, White MT, Mueller I, Castro MC, et al. Effect of out-of-village working activities on recent malaria exposure in the Peruvian Amazon using parametric g-formula. *Sci Rep.* 2022 Nov 9;12(1):19144.
 16. Gomez J, Grosso A, Guzman-Guzman M, Castillo SG, Castro MC, Torres K, et al. Human mobility and malaria risk in peri-urban and rural communities in the Peruvian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis.* 2025 Jan 6;19(1):e0012058.
 17. Li Y, Stewart K, Han KT, Han ZY, Aung PP, Thein ZW, et al. Understanding Spatiotemporal Human Mobility Patterns for Malaria Control Using a Multiagent Mobility Simulation Model. *Clin Infect Dis.* 2023 Feb

1;76(3):e867–74.

18. Johansen IC, Rodrigues PT, Ferreira MU. Human mobility and urban malaria risk in the main transmission hotspot of Amazonian Brazil. *PloS One*. 2020;15(11):e0242357.
19. Instituto Nacional de Estadística e Informática. Loreto: Resultados Definitivos de los Censos Nacionales 2017 [Internet]. 2018 [cited 2024 Nov 5]. Available from:
https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1561/
20. Ministerio de Salud del Perú. Sala Situacional de Malaria en el Perú 2020 - 2025 [Internet]. 2025. Available from:
<https://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/sala/2025/SE09/malaria.pdf>
21. Soto-Calle V, Rosas-Aguirre A, Llanos-Cuentas A, Abatih E, DeDeken R, Rodriguez H, et al. Spatio-temporal analysis of malaria incidence in the Peruvian Amazon Region between 2002 and 2013. *Sci Rep*. 2017 Jan 16;7(1):40350.
22. Ministerio de Salud del Perú. Plan Malaria Cero Periodo 2017-2021 [Internet]. 2017. Available from:
https://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/04/965065/rm_244-2017-minsa.pdf
23. Rosado J, Carrasco-Escobar G, Nolasco O, Garro K, Rodriguez-Ferruci H, Guzman-Guzman M, et al. Malaria transmission structure in the Peruvian Amazon through antibody signatures to *Plasmodium vivax*. *PLoS Negl Trop*

Dis. 2022 May 9;16(5):e0010415.

24. Ministerio de Salud. Documento Técnico: Plan Hacia la Eliminación de la Malaria en el Perú 2022–2030. 2022.
25. Gebhardt ME, Searle KM, Kobayashi T, Shields TM, Hamapumbu H, Simubali L, et al. Understudied Anophelines Contribute to Malaria Transmission in a Low-Transmission Setting in the Choma District, Southern Province, Zambia. 2022 May 4 [cited 2024 Jun 17]; Available from: <https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/106/5/article-p1406.xml>
26. Byrne I, Cramer E, Nelli L, Rerolle F, Wu L, Patterson C, et al. Characterizing the spatial distribution of multiple malaria diagnostic endpoints in a low-transmission setting in Lao PDR. *Front Med* [Internet]. 2022 Aug 18 [cited 2024 Jun 17];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2022.929366>
27. Stresman G, Kobayashi T, Kamanga A, Thuma PE, Mharakurwa S, Moss WJ, et al. Malaria research challenges in low prevalence settings. *Malar J*. 2012 Oct 25;11(1):353.
28. Saavedra-Samillán M, Burgos F, García Huamán F, Valdivia HO, Gamboa D, Chenet SM. Spatiotemporal dynamics of malaria and climate influence on its incidence in Condorcanqui Province, 2005–2022. *Malar J*. 2024 Dec 18;23(1):380.
29. Kamdem C, Fouet C, Etouna J, Etoa FX, Simard F, Besansky NJ, et al. Spatially Explicit Analyses of Anopheline Mosquitoes Indoor Resting Density:

- Implications for Malaria Control. PLOS ONE. 2012 Feb 14;7(2):e31843.
30. Ya-Umphun P, Cerqueira D, Cottrell G, Parker DM, Fowkes FJI, Nosten F, et al. Anopheles Salivary Biomarker as a Proxy for Estimating Plasmodium falciparum Malaria Exposure on the Thailand–Myanmar Border. 2018 Jun 4 [cited 2024 Jun 17]; Available from: <https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/99/2/article-p350.xml>
 31. Bousema T, Drakeley C, Gesase S, Hashim R, Magesa S, Mosha F, et al. Identification of Hot Spots of Malaria Transmission for Targeted Malaria Control. J Infect Dis. 2010 Jun 1;201(11):1764–74.
 32. Nath MJ, Bora AK, Yadav K, Talukdar PK, Dhiman S, Baruah I, et al. Prioritizing areas for malaria control using geographical information system in Sonitpur district, Assam, India. Public Health. 2013 Jun 1;127(6):572–8.
 33. World Health Organization. A framework for malaria elimination [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2017 [cited 2025 Mar 20]. 92 p. Available from: <https://iris.who.int/handle/10665/254761>
 34. Organización Mundial de la Salud. Estrategia técnica mundial contra la malaria 2016-2030 [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2015 [cited 2025 Mar 20]. 30 p. Available from: <https://iris.who.int/handle/10665/186671>
 35. Reif SS, DesHarnais S, Bernard S. Rural Health Research Community Perceptions of the Effects of Rural Hospital Closure on Access to Care. J Rural Health. 1999;15(2):202–9.

36. Chan L, Hart LG, Goodman DC. Geographic Access to Health Care for Rural Medicare Beneficiaries. *J Rural Health*. 2006;22(2):140–6.
37. Carrasco-Escobar G, Manrique E, Tello-Lizarraga K, Miranda JJ. Travel Time to Health Facilities as a Marker of Geographical Accessibility Across Heterogeneous Land Coverage in Peru. *Front Public Health* [Internet]. 2020 Sep 16 [cited 2024 Jun 18];8. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/public-health/articles/10.3389/fpubh.2020.00498/full>
38. Furnival-Adams J, Olanga E, Napier M, Garner P. House modifications for preventing malaria. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2020 [cited 2024 Jun 18];10. Available from: <https://consensus.app/papers/house-modifications-preventing-malaria-furnivaladams/8833373d67b85d00a83a24b99f095c2d/>
39. Fornace K, Reyes RA, Macalinao ML, Bareng AP, Luchavez J, Hafalla J, et al. Environmentally targeting surveillance using forest data and health facility surveys improves detection of malaria transmission foci. *medRxiv* [Internet]. 2020 [cited 2024 Jun 18]; Available from: <https://consensus.app/papers/environmentally-targeting-surveillance-using-data-fornace/eaf3966789455b7a87276b11ffe397fe/>
40. Atkinson J, Vallely A, Fitzgerald L, Whittaker M, Tanner M. The architecture and effect of participation: a systematic review of community participation for communicable disease control and elimination. Implications for malaria elimination. *Malar J*. 2011;10:225–225.

41. Adhikari B, James N, Newby G, Seidlein L von, White N, Day N, et al. Community engagement and population coverage in mass anti-malarial administrations: a systematic literature review. *Malar J* [Internet]. 2016 [cited 2024 Jun 18];15. Available from: <https://consensus.app/papers/community-population-coverage-mass-administrations-adhikari/169d1e55b8b550b181ead08db7fa13d5/>
42. Maung C, Sein T, Hlaing T, Okanurak K, Silawan T, Kaewkungwal J. Promoting community malaria control in rural Myanmar through an active community participation program using the participatory learning approach. *Rural Remote Health* [Internet]. 2017 [cited 2024 Jun 18];17 2. Available from: <https://consensus.app/papers/promoting-community-malaria-control-myanmar-community-maung/f165912a71f55a619cbcbcd549c7de2b/>
43. Johnson AD, Thiero O, Whidden C, Poudiougou B, Diakité D, Traoré F, et al. Proactive community case management and child survival in periurban Mali. *BMJ Glob Health* [Internet]. 2018 Mar 12 [cited 2025 Mar 26];3(2). Available from: <https://gh.bmj.com/content/3/2/e000634>
44. Adhikari B, Bayo M, Peto TJ, Callery JJ, Tripura R, Dysoley L, et al. Comparing the roles of community health workers for malaria control and elimination in Cambodia and Tanzania. *BMJ Glob Health* [Internet]. 2023 Dec 9 [cited 2025 Mar 26];8(12). Available from: <https://gh.bmj.com/content/8/12/e013593>
45. Garg S, Gurung P, Dewangan M, Nanda P. Coverage of community case management for malaria through CHWs: a quantitative assessment using

- primary household surveys of high-burden areas in Chhattisgarh state of India. *Malar J.* 2020 Jun 22;19(1):213.
46. Elliott P, Wartenberg D. Spatial Epidemiology: Current Approaches and Future Challenges. *Environ Health Perspect.* 2004;112:998–1006.
47. Gatrell A, Bailey T, Diggle P, Rowlingson B. Spatial point pattern analysis and its application in geographical epidemiology. *Trans Inst Br Geogr.* 1996;21:256–74.
48. Ostfeld RS, Glass GE, Keesing F. Spatial epidemiology: an emerging (or re-emerging) discipline. *Trends Ecol Evol.* 2005 Jun 1;20(6):328–36.
49. Derksen C, Wulder M, LeDrew E, Goodison B. Associations between spatially autocorrelated patterns of SSM/I-derived prairie snow cover and atmospheric circulation. *Hydrol Process.* 1998;12:2307–16.
50. Wulder M, Boots B. Local spatial autocorrelation characteristics of remotely sensed imagery assessed with the Getis statistic. *Int J Remote Sens.* 1998;19:2223–31.
51. Zhang T. Limiting distribution of the G statistics. *Stat Probab Lett.* 2008 Sep;78(12):1656–61.
52. Getis A, Ord JK. The Analysis of Spatial Association by Use of Distance Statistics. In: Anselin L, Rey SJ, editors. *Perspectives on Spatial Data Analysis* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2010 [cited 2025 Mar 20]. p. 127–45. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-642-01976-0_10

53. Reisen W. Landscape epidemiology of vector-borne diseases. *Annu Rev Entomol.* 2010;55:461–83.
54. Lambin EF, Tran A, Vanwambeke S, Linard C, Soti V. Pathogenic landscapes: Interactions between land, people, disease vectors, and their animal hosts. *Int J Health Geogr.* 2010;9:54–54.
55. Brooker S. Spatial epidemiology of human schistosomiasis in Africa: risk models, transmission dynamics and control. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007 Jan 1;101(1):1–8.
56. Gebreslasie MT. A review of spatial technologies with applications for malaria transmission modelling and control in Africa. *Geospat Health.* 2015 Nov 26;10(2):328.
57. Kreuels B, Kobbe R, Adjei S, Kreuzberg C, Reden C von, Bäter K, et al. Spatial variation of malaria incidence in young children from a geographically homogeneous area with high endemicity. *J Infect Dis.* 2008;197 1:85–93.
58. Mitani A, Mercaldo N, Haneuse S, Schildcrout J. Survey design and analysis considerations when utilizing misclassified sampling strata. *BMC Med Res Methodol* [Internet]. 2021 [cited 2024 Jun 18];21. Available from: <https://consensus.app/papers/survey-design-analysis-considerations-utilizing-mitani/739df639666d5d3081e506c2c29a0715/>
59. Ozturk O. Post-stratified Probability-Proportional-to-Size Sampling from Stratified Populations. *J Agric Biol Environ Stat.* 2019 Dec 1;24(4):693–718.

60. Elliott P, Martuzzi M, Shaddick G. Spatial statistical methods in environmental epidemiology: a critique. *Stat Methods Med Res.* 1995;4:137–59.
61. Das NG, Dhiman S, Talukdar PK, Goswami D, Rabha B, Baruah I, et al. Role of asymptomatic carriers and weather variables in persistent transmission of malaria in an endemic district of Assam, India. *Infect Ecol Epidemiol.* 2015 Jan 1;5(1):25442.
62. Aguilar JB, Gutierrez JB. An Epidemiological Model of Malaria Accounting for Asymptomatic Carriers. *Bull Math Biol.* 2020 Mar 14;82(3):42.
63. Carrasco-Escobar G, Matta-Chuquisapon J, Manrique E, Ruiz-Cabrejos J, Barboza JL, Wong D, et al. Quantifying the effect of human population mobility on malaria risk in the Peruvian Amazon. *R Soc Open Sci.* 2022 Jul 20;9(7):211611.
64. Intraclass correlation adjustments to maintain power in cluster trials for binary outcomes. *Contemp Clin Trials.* 2009 Sep 1;30(5):473–80.
65. Sturrock HJW, Bennett AF, Midekisa A, Gosling RD, Gething PW, Greenhouse B. Mapping Malaria Risk in Low Transmission Settings: Challenges and Opportunities. *Trends Parasitol.* 2016 Aug;32(8):635–45.
66. Mousam A, Maggioni V, Delamater PL, Quispe AM. Using remote sensing and modeling techniques to investigate the annual parasite incidence of malaria in Loreto, Peru. *Adv Water Resour.* 2017 Oct;108:423–38.
67. Torres K, Alava F, Soto-Calle V, Llanos-Cuentas A, Rodriguez H,

- Llacsahuanga L, et al. Malaria Situation in the Peruvian Amazon during the COVID-19 Pandemic. *Am J Trop Med Hyg.* 2020 Nov;103(5):1773–6.
68. Heuschen AK, Abdul-Mumin A, Adokiya M, Lu G, Jahn A, Razum O, et al. Impact of the COVID-19 pandemic on malaria cases in health facilities in northern Ghana: a retrospective analysis of routine surveillance data. *Malar J.* 2022 May 15;21(1):149.
69. Rahi M, Nazmeen A, Kumar S, Yadav CP, Kumar G, Mittal P, et al. Enhancing healthcare access and malaria management via mobile clinics and phone call services in Nuh district of Haryana, India. *J Vector Borne Dis.* 2024 Jul 1;61(3):406–12.
70. Zhang F, Song T, Cheng X, Li T, Yang Z. Transportation Infrastructure, Population Mobility, and Public Health. *Int J Environ Res Public Health.* 2022 Dec 31;20(1):751.
71. Nhavoto JA, Grönlund Å. Mobile Technologies and Geographic Information Systems to Improve Health Care Systems: A Literature Review. *JMIR MHealth UHealth* [Internet]. 2014 [cited 2024 Jun 18];2. Available from: <https://consensus.app/papers/mobile-technologies-geographic-information-systems-nhavoto/6aeedcb6ea5354e594bdc00a1a034bb4/>
72. Ohrt C, Roberts K, Sturrock H, Wegbreit J, Lee BY, Gosling R. Information Systems to Support Surveillance for Malaria Elimination. *Am J Trop Med Hyg.* 2015;93:145–52.
73. Carrasco-Escobar G, Fornace K, Wong D, Padilla-Huamantínco PG, Saldaña-

- Lopez JA, Castillo-Meza OE, et al. Open-Source 3D Printable GPS Tracker to Characterize the Role of Human Population Movement on Malaria Epidemiology in River Networks: A Proof-of-Concept Study in the Peruvian Amazon. *Front Public Health*. 2020;8:526468.
74. Stresman G, Nelli L, Wu L, Byrne I, Surendra H, Fernandez-Camacho B, et al. Evidence-based decision making for malaria elimination applying the Freedom From Infection statistical framework in five malaria eliminating countries: an observational study. *Lancet Glob Health*. 2025 Sep 1;13(9):e1591–604.
75. Rosas-Aguirre A, Speybroeck N, Llanos-Cuentas A, Rosanas-Urgell A, Carrasco-Escobar G, Rodriguez H, et al. Hotspots of Malaria Transmission in the Peruvian Amazon: Rapid Assessment through a Parasitological and Serological Survey. *PloS One*. 2015;10(9):e0137458.
76. Drakeley CJ, Corran PH, Coleman PG, Tongren JE, McDonald SLR, Carneiro I, et al. Estimating medium- and long-term trends in malaria transmission by using serological markers of malaria exposure. *Proc Natl Acad Sci*. 2005 Apr 5;102(14):5108–13.
77. Pothin E, Ferguson NM, Drakeley CJ, Ghani AC. Estimating malaria transmission intensity from *Plasmodium falciparum* serological data using antibody density models. *Malar J*. 2016 Feb 9;15:79.
78. Surendra H, Wijayanti MA, Murhandarwati EH, Irnawati, Yuniarti T, Mardiaty, et al. Analysis of serological data to investigate heterogeneity of malaria transmission: a community-based cross-sectional study in an area conducting

elimination in Indonesia. *Malar J.* 2019 Jul 8;18(1):227.

79. Muggeo VMR. Estimating regression models with unknown break-points. *Stat Med.* 2003;22(19):3055–71.
80. Muggeo VMR. Segmented: An R package to fit regression models with broken-line relationships. *R News.* 2008 May 1;8(1):20–5.

IV. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Métodos suplementarios

Cuestionarios de recolección de datos

El presente estudio forma parte del proyecto multicéntrico Freedom From Infection (FFI), una colaboración internacional liderada por la London School of Hygiene and Tropical Medicine (LSHTM), implementada en cinco países con contextos de transmisión de malaria muy baja (74). Como parte de este esfuerzo conjunto, se utilizaron cuestionarios previamente estandarizados para entornos similares. Los formularios originales fueron desarrollados en inglés por el equipo internacional, y posteriormente fueron traducidos al español por el equipo de investigación local en Perú. Antes del inicio de la recolección oficial de los datos, se realizó un piloto en campo cuyo objetivo fue evaluar la interpretabilidad, comprensión y duración de la encuesta, así como verificar la operatividad de la herramienta en REDCap y REDCap Mobile, instalados en tablets. Este piloto permitió identificar y corregir errores en la programación de saltos lógicos y flujos condicionales dentro del formulario, así como ajustar preguntas que no resultaban del todo comprensibles para los participantes. Estos procesos aseguraron la estandarización de la recolección de datos en el contexto local.

Cálculo de la potencia estadística

Dado que el presente estudio de tesis, se trata de un estudio de datos secundarios, se calculó la potencia estadística para detectar diferencias entre los grupos. Debido a que la variable independiente principal (cuartil de distancia hacia los centros de salud) fue categorizada en cuartiles, se decidió complementar el análisis con un

enfoque de comparaciones por pares entre grupos. Esto permitió aplicar pruebas específicas de diferencia de proporciones entre dos grupos, facilitando el cálculo de potencia estadística mediante métodos clásicos y más conservadores.

En particular, se realizaron comparaciones entre el cuartil de referencia (cuartil de distancia próxima, $n = 1349$, con una prevalencia esperada (PE) del 16.4%) y los demás cuartiles: distancia media (PE = 42.3%, $n = 692$), distancia lejana (PE = 46.7%, $n = 1031$) (75). El cálculo de potencia fue realizado en Stata mediante el comando *power twoproportions*, asumiendo un nivel de significancia bilateral de $\alpha = 0.05$.

Grupos	Diferencia	Potencia
Distancia próxima vs. Distancia media (16.4% vs 42.3%)	0.2590	100.00%
Distancia próxima vs. Distancia lejana (16.4% vs 46.7%)	0.3030	100.00%

Estos resultados sugieren que el estudio tuvo una alta potencia estadística para detectar diferencias en la prevalencia de malaria. No se calculó la potencia específicamente para los pares de categorías “distancia próxima” y “distancia muy lejana”, debido a la falta de referencias en la literatura sobre la frecuencia esperada en el último grupo. Sin embargo, se asumiría una frecuencia mayor, por lo que no

se anticipan variaciones importantes en comparación con los estimados previamente evaluados.

Además, se estimó como ejercicio complementario que el estudio tiene una potencia del 90% para detectar diferencias de hasta 0.0500, lo que demuestra su capacidad para identificar variaciones del 5%.

Serología

Como parte del protocolo de laboratorio del estudio multicéntrico FFI, todas las muestras recolectadas fueron procesadas utilizando el panel estandarizado de antígenos desarrollado por el equipo de serología de LSHTM, el cual incluyó cuatro antígenos de *P. vivax* y siete antígenos de *P. falciparum* asociados a exposición reciente e histórica. Este enfoque respondió a una lógica exploratoria, reconociendo que algunos antígenos pueden no ser informativos en todos los contextos geográficos, ya sea por falta de reactividad inmunológica (por ejemplo, por ausencia de circulación de ciertos linajes de *Plasmodium* en la zona) o por colinealidad entre antígenos altamente correlacionados. En la etapa analítica se aplicó un enfoque parsimonioso y estandarizado, priorizando aquellos antígenos con mayor robustez como marcadores inmunológicos según su inmunogenicidad documentada y longevidad de respuesta en el sistema inmune (6,8,76). Por tanto, aunque los antígenos GLURPR2 (exposición histórica), GEXP18 y HSP40Ag1 (exposición reciente), y RH2.2030 fueron evaluados en laboratorio como parte del panel completo, no fueron incluidos en el análisis final de seropositividad, con el objetivo de reducir el ruido estadístico, optimizar la comparabilidad entre sitios y evitar redundancias analíticas.

Análisis estadístico

El presente estudio se basó en un diseño de muestreo multietápico, por lo tanto, se asumió la existencia de una estructura jerárquica en los datos, con posibles correlaciones intraestablecimiento, intracomunidad e intrahogar. Por ello, el análisis estadístico contempló la aplicación de modelos de regresión de Poisson con estructura multinivel, incorporando interceptos aleatorios para establecimiento de salud, comunidad y hogar, y empleando errores robustos para garantizar estimaciones válidas ante la correlación interna de las observaciones. El objetivo fue estimar razones de prevalencia (RP) tanto crudas como ajustadas. Todos los análisis se realizaron en el software R, mediante el entorno RStudio, utilizando el paquete lme4 para la especificación de los modelos jerárquicos.

Selección de variables

Para la construcción de los modelos multivariados, se siguió un procedimiento sistemático de selección de covariables basado en significancia estadística en el análisis bivariado. Inicialmente, se calcularon razones de prevalencia crudas para cada covariable y desenlace (seropositividad reciente e histórica a *P. vivax* y *P. falciparum*) por separado. Aquellas covariables con un valor $p < 0.05$ en el análisis bivariado fueron seleccionadas para ingresar al modelo multivariado correspondiente. Este enfoque se aplicó de manera consistente a los cuatro desenlaces evaluados. En el caso de la exposición reciente a *P. falciparum*, ninguna variable alcanzó significancia estadística en el análisis bivariado; por lo tanto, no se identificaron covariables para la construcción de un modelo multivariado. No obstante, se exploró un modelo alternativo incorporando las

covariables significativas del análisis bivariado de la exposición histórica a *P. falciparum*, pero los modelos no lograron converger debido al bajo número de eventos positivos.

Regresión lineal segmentada

Se implementó un análisis de regresión lineal segmentada con el objetivo de identificar cambios en la evolución de la exposición a la malaria. La elección de esta regresión como método analítico en este estudio respondió a la necesidad específica de identificar puntos críticos o cambios significativos en la seroprevalencia según la edad.

Inicialmente se consideró el uso de modelos catalíticos para estimar tasas de seroconversión, metodología ampliamente usada en estudios serológicos de malaria y otras enfermedades infecciosas transmitidas por vectores (76–78). Sin embargo, debido a la muy baja prevalencia observada en nuestro contexto de estudio, estos modelos no lograron converger adecuadamente, limitando su utilidad. Frente a ello, se exploró visualmente la relación entre seropositividad y edad, observándose indicios claros de una relación con puntos de cambio o quiebre, particularmente en grupos etarios mayores. Por esta razón, se recurrió a la regresión lineal segmentada, técnica recomendada específicamente para detectar cambios o puntos de inflexión en relaciones no lineales (79,80).

La regresión con *splines* cúbicos o naturales podría haber sido considerada como una alternativa para modelar la relación entre la edad y la seroprevalencia de

malaria. Sin embargo, se optó por utilizar la regresión lineal segmentada debido a que nuestro objetivo analítico no era únicamente describir una relación suavizada y flexible entre ambas variables, sino específicamente identificar y cuantificar puntos críticos o *breakpoints* de cambio en la exposición a malaria según grupos de edad claramente delimitados. Los modelos *spline* proporcionan una curva flexible y suavizada, pero no identifican explícitamente puntos específicos de cambio o inflexión de manera sencilla, lo cual era clave en el contexto de este estudio, dado que estábamos particularmente interesados en detectar claramente edades específicas en las que se presentaba un cambio en la exposición a la enfermedad.

Resultados suplementarios

En el modelo de regresión de Poisson multinivel, que incorporó efectos aleatorios a nivel de establecimiento de salud, comunidad y hogar, se identificaron asociaciones significativas entre la seropositividad a malaria por tipo de exposición y la categoría de distancia hacia los centros de salud. El coeficiente de correlación intraclase (CCI) para *P. vivax* reciente y *P. vivax* histórico fue de 0.568 y 0.348, respectivamente, lo que indica una considerable variabilidad atribuible a la estructura jerárquica de los datos. En el caso de *P. falciparum*, el CCI para ambas exposiciones fue de 0.038. Si bien este valor es bajo, se optó por mantener el enfoque multinivel, ya que el diseño metodológico del estudio presenta una jerarquía claramente definida que justifica el uso de este tipo de modelamiento para ajustar adecuadamente la dependencia entre observaciones.

Al evaluar la exposición reciente a *P. vivax*, se confirmó una asociación estadísticamente significativa entre el cuartil de distancia hacia los establecimientos de salud y la seropositividad. Los residentes del cuartil más alejado tuvieron mayor probabilidad de exposición reciente en comparación con los del cuartil más próximo (RP = 15.29; IC95%: 5.52 - 42.35; $p < 0.001$) luego de ajustar por edad, sexo, actividad económica, viaje en el último mes, lugar donde se baña y síntomas presentados el último mes (**Tabla Suplementaria 1**).

Cuando se examinó la seropositividad reciente a *P. falciparum*, no se identificaron asociaciones estadísticamente significativas con ninguna de las variables incluidas en el modelo bivariado ni en el ajustado (**Tabla Suplementaria 2**).

En el modelo ajustado para evaluar la seropositividad histórica a *P. vivax*, se evidenció mayor exposición en quienes vivían en el cuartil más alejado hacia centros de salud en comparación con el cuartil más cercano (RP = 6.95; IC95%: 3.35 - 14.40; $p < 0.001$) ajustando por sexo, edad, actividad económica, viaje en el último mes y síntomas experimentados en el último mes. Del mismo modo, aquellas personas que residían en el cuartil de distancia larga tuvieron mayor exposición histórica a *P. vivax* en comparación a aquellas personas que residían en el cuartil de distancia menor (RP = 6.80; IC95%: 3.33 - 13.90; $p < 0.001$), luego de ajustar por las mismas variables. Estos resultados guardan coherencia con los obtenidos en la exposición reciente (**Tabla Suplementaria 3**).

Finalmente, al evaluar la seropositividad histórica a *P. falciparum*, se observó que aquellas personas que se encontraban en el cuartil de distancia extrema (RP = 2.41; IC95%: 0.68 - 8.51; $p = 0.173$) y larga (RP = 2.18; IC95%: 0.83 - 5.70; $p = 0.114$) reportaron mayor exposición a malaria en comparación con aquellos que se encontraban en el cuartil más próximo, sin embargo, esta asociación no fue estadísticamente significativa (**Tabla Suplementaria 4**).

Tablas suplementarias

Tabla Suplementaria 1. Análisis multinivel mediante regresión de Poisson modificada para la exposición reciente a *P. vivax*.

Variable	<i>P. vivax</i> Reciente							
	Análisis bivariado				Análisis Multivariado*			
	RP	IC 95%		p	RP	IC 95%		p
Distrito								
Belén	-	-	-	-	-	-	-	-
Indiana	0.28	0.03	2.52	0.253	-	-	-	-
Sexo								
Masculino	-	-	-	-	-	-	-	-
Femenino	0.32	0.23	0.45	<0.001	0.34	0.20	0.56	<0.001
Edad (años)	1.04	1.03	1.05	<0.001	1.03	1.02	1.04	<0.001
Actividad económica								
Ninguna	-	-	-	-	-	-	-	-
Relacionada al bosque	7.79	4.37	13.88	<0.001	2.99	1.50	5.04	0.001
Comerciante	3.34	0.96	11.67	0.058	2.95	0.81	10.75	0.101
Ama de casa	2.61	1.33	5.11	0.005	2.75	1.37	6.53	0.006
Estudiante	0.27	0.09	0.81	0.019	0.43	0.14	1.35	0.148
Otros	3.03	1.09	8.40	0.033	1.43	0.50	4.10	0.507
Viaje en el último mes								
No	-	-	-	-	-	-	-	-
Sí	0.92	0.56	1.53	0.759	-	-	-	-
Lugar donde se baña								
Baño dentro de la vivienda	-	-	-	-	-	-	-	-
Baño fuera de la vivienda	1.33	0.54	3.31	0.533	-	-	-	-
En el río	2.45	0.63	9.59	0.198	-	-	-	-
Otros	1.39	0.67	2.88	0.379	-	-	-	-
Síntomas durante el último mes								
Fiebre								
Sí	1.73	1.18	2.54	0.005	1.54	1.02	2.31	0.039
Dolor de cabeza								
Sí	2.19	1.53	3.13	<0.001	1.09	0.73	1.62	0.666
Dolor de músculos o articulaciones								
Sí	2.27	1.50	3.43	<0.001	0.79	0.51	1.24	0.305
Malestar general								
Sí	2.39	1.58	3.63	<0.001	1.21	0.77	1.91	0.411
Cuartil de distancia hacia los centros de salud								

Distancia próxima	-				-	-	-	-
Distancia media	1.79	0.57	5.56	0.316	1.71	0.55	5.33	0.355
Distancia larga	10.40	3.54	30.53	<0.001	8.88	3.20	24.63	<0.001
Distancia extrema	16.76	5.70	49.27	<0.001	15.29	5.52	42.35	<0.001

*Regresión de Poisson multinivel ajustada por sexo, edad, actividad económica, síntomas durante el último mes y malaria autorreportada.

RP: Razón de Prevalencia, IC 95%: Intervalo de confianza al 95%.

Tabla Suplementaria 2. Análisis multinivel mediante regresión de Poisson modificada para la exposición reciente a *P. falciparum*.

Variable	<i>P. falciparum</i> Reciente					
	Análisis bivariado			Análisis Multivariado		
	RP	IC 95%	p	RP	IC 95%	p
Distrito						
Belén	-	-	-	-	-	-
Indiana	0.55	0.06	5.52	0.612	-	-
Sexo						
Masculino	-	-	-	-	-	-
Femenino	0.90	0.34	2.36	0.832	-	-
Edad (años)	0.97	0.95	1.00	0.089	-	-
Actividad económica						
Ninguna	-	-	-	-	-	-
Relacionada al bosque	0.47	0.10	2.28	0.350	-	-
Comerciante	1.74	0.08	38.20	0.726	-	-
Ama de casa	0.27	0.05	1.59	0.147	-	-
Estudiante	0.36	0.08	1.71	0.196	-	-
Otros	-	-	-	-	-	-
Síntomas durante el último mes						
Fiebre						
Sí	1.26	0.25	6.34	0.783	-	-
Dolor de cabeza						
Sí	0.37	0.04	3.19	0.365	-	-
Cuartil de distancia hacia los centros de salud						
Distancia próxima	-	-	-	-	-	-
Distancia media	1.54	0.05	50.72	0.809	-	-
Distancia larga	1.60	0.07	36.54	0.770	-	-
Distancia extrema	2.14	0.11	43.70	0.621	-	-

RP: Razón de Prevalencia, IC 95%: Intervalo de confianza al 95%.

Tabla Suplementaria 3. Análisis multinivel mediante regresión de Poisson modificada para la exposición histórica a *P. vivax*.

Variable	<i>P. vivax</i> Histórico							
	Análisis bivariado				Análisis Multivariado*			
	RP	IC 95%		p	RP	IC 95%		p
Distrito								
Belén	-	-	-	-	-	-	-	-
Indiana	0.37	0.09	1.55	0.175	-	-	-	-
Sexo								
Masculino	-	-	-	-	-	-	-	-
Femenino	0.53	0.40	0.71	<0.001	0.59	0.40	0.89	0.011
Edad (años)	1.04	1.03	1.05	<0.001	1.03	1.02	1.04	<0.001
Actividad económica								
Ninguna	-	-	-	-	-	-	-	-
Relacionada al bosque	6.94	4.05	11.90	<0.001	2.66	1.47	4.51	0.001
Comerciante	2.81	0.82	9.61	0.100	1.85	0.53	6.54	0.338
Ama de casa	3.65	2.02	6.60	<0.001	2.58	1.37	5.16	0.004
Estudiante	0.44	0.19	1.03	0.057	0.75	0.31	1.85	0.537
Otros	4.62	2.03	10.52	<0.001	1.99	0.86	4.63	0.110
Viaje en el último mes								
No	-	-	-	-	-	-	-	-
Sí	1.66	1.13	2.45	0.010	1.23	0.83	1.82	0.310
Lugar donde se baña								
Baño dentro de la vivienda	-	-	-	-	-	-	-	-
Baño fuera de la vivienda	1.08	0.55	2.12	0.816	-	-	-	-
En el río	0.25	0.03	1.82	0.171	-	-	-	-
Otros	0.71	0.41	1.23	0.221	-	-	-	-
Síntomas durante el último mes								
Fiebre								
Sí	1.31	0.89	1.95	0.172	-	-	-	-
Dolor de cabeza								
Sí	1.80	1.26	2.56	0.001	1.10	0.76	1.60	0.608
Dolor de músculos o articulaciones								
Sí	1.73	1.14	2.62	0.010	0.62	0.39	0.96	0.034
Malestar general								
Sí	1.71	1.12	2.62	0.013	1.08	0.68	1.71	0.748
Cuartil de distancia hacia los centros de salud								
Distancia próxima	-	-	-	-	-	-	-	-

Distancia media	1.29	0.52	3.17	0.581	1.11	0.46	2.67	0.818
Distancia larga	8.07	3.80	17.15	<0.001	6.80	3.33	13.90	<0.001
Distancia extrema	7.55	3.47	16.46	<0.001	6.95	3.36	14.40	<0.001

*Regresión de Poisson multinivel ajustada por sexo, edad, actividad económica, viaje en el último mes, condición de dolor de cabeza, dolor muscular o articular, malestar general y malaria autorreportada.

RP: Razón de Prevalencia, IC 95%: Intervalo de confianza al 95%.

Tabla Suplementaria 4. Análisis multinivel mediante regresión de Poisson modificada para la exposición histórica a *P. falciparum*.

Variable	<i>P. falciparum</i> Histórico							
	Análisis bivariado			Análisis Multivariado*				
	RP	IC 95%	p	RP	IC 95%	p		
Distrito								
Belén	-	-	-	-	-	-		
Indiana	0.30	0.10	0.91	0.034	0.31	0.14	0.68	0.004
Sexo								
Masculino	-	-	-	-	-	-	-	
Femenino	0.71	0.45	1.11	0.134				
Edad (años)	1.02	1.01	1.03	<0.001	1.02	1.01	1.03	0.006
Actividad económica								
Ninguna	-	-	-	-	-	-	-	-
Relacionada al bosque	5.15	2.25	11.78	<0.001	2.46	0.99	6.08	0.052
Comerciante	4.86	1.25	18.92	0.023	2.28	0.52	9.92	0.271
Ama de casa	2.84	1.13	7.11	0.026	1.56	0.59	4.12	0.370
Estudiante	2.07	0.83	5.14	0.119	2.17	0.84	5.63	0.110
Otros	1.11	0.15	8.53	0.918	0.54	0.06	4.88	0.582
Viaje en el último mes								
No	-	-	-	-	-	-	-	-
Sí	0.74	0.29	1.86	0.515	-	-	-	-
Lugar donde se baña								
Baño dentro de la vivienda	-	-	-	-	-	-	-	-
Baño fuera de la vivienda	1.26	0.47	3.38	0.642	-	-	-	-
En el río	1.53	0.32	7.38	0.595	-	-	-	-
Otros	0.97	0.42	2.21	0.934	-	-	-	-
Síntomas durante el último mes								
Fiebre								
Sí	1.64	0.89	3.02	0.110	-	-	-	-
Dolor de cabeza								
Sí	2.28	1.33	3.92	0.003	1.63	0.93	2.87	0.090
Dolor de músculos o articulaciones								
Sí	1.81	0.93	3.51	0.079	-	-	-	-
Malestar general								
Sí	1.23	0.53	2.84	0.631	-	-	-	-
Cuartil de distancia hacia los centros de salud								
Distancia próxima	-	-	-	-	-	-	-	-

Distancia media	1.19	0.46	3.05	0.717	1.12	0.42	2.96	0.824
Distancia larga	1.91	0.68	5.35	0.217	2.18	0.83	5.70	0.114
Distancia extrema	1.704	0.56	5.224	0.351	2.41	0.68	8.51	0.173

*Regresión de Poisson multinivel ajustada por distrito, edad, actividad económica, condición de dolor de cabeza y malaria autorreportada.

RP: Razón de Prevalencia, IC 95%: Intervalo de confianza al 95%.