

Ausencia de infecciones asintomáticas de malaria en una región endémica de Honduras

Gustavo Fontecha ¹

Lino Carmenate ²

Joel García ³

Brian Erazo, Juan Amador, Nestor Yanes ⁴

Isis Buezo, Fabiola Martel ⁵

Mariela Carrasco ⁶

RESUMEN

Ha existido un progreso considerable en la lucha contra la malaria en el mundo. En Honduras encontramos una reducción de los casos de más de 17,000 a 3,564 en la última década. Para cumplir con las metas de eliminación de la malaria, las estrategias deben de considerar a todos los individuos infectados por malaria en las intervenciones, por lo que adquiere mayor valor los esfuerzos enfocados en identificar las infecciones asintomáticas. El presente estudio tiene como objetivo evaluar la prevalencia de casos de infección asintomática de malaria en 3 comunidades del municipio de Iriona, Colón, Honduras para enero del 2015. Se realizó un estudio descriptivo transversal, en las comunidades de Ciriboya, Punta Piedra y Cusuna, Colón durante enero del 2015. Mediante un muestreo aleatorio simple se incluyeron 145 participantes. Se realizó el diagnóstico de infección de malaria asintomática mediante gota gruesa, PCR convencional y PCR anidada. En el análisis microscópico no se detectaron muestras de gota gruesa positivas, resultando en una prevalencia de 0.00%. El abordaje molecular tampoco detectó infecciones. Los hallazgos de este estudio concuerdan con el patrón de estudios anteriores en Honduras y con el avance que se ha tenido contra la malaria en el país. La detección activa de casos es recomendada

¹ Coordinador académico de Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas y del Centro de investigaciones Genéticas, profesor de la Facultad de Ciencias, UNAH: gustavo.fontecha@una-h.edu.hn

² Profesor del Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias Médicas, UNAH

³ Profesor del Departamento de Parasitología, Facultad de Ciencias, UNAH

⁴ Estudiantes egresados de la Carrera de Medicina, Facultad de Ciencias Médicas, UNAH

⁵ Estudiantes egresadas de la Carrera de microbiología, Facultad de Ciencias, UNAH

⁶ Médico Interno, Hospital Escuela Universitario

para intervenciones en lugares donde la transmisión de la malaria se ha reducido hasta niveles bajos, por lo que su implementación en Honduras debe de ser parte de la estrategia integral de los programas de eliminación.

Palabras clave: *riesgo, prevención, educación sanitaria, manipulación de alimentos.*

ABSTRACT

There has been considerable progress in the fight against malaria in the world. In Honduras we find a reduction of cases from more than 17,000 to 3,564 in the last decade. To meet malaria elimination goals, strategies should consider all malaria-infected individuals in its interventions, so efforts to identify asymptomatic infections become of greater value and interest. The present study aims to evaluate the prevalence of cases of asymptomatic malaria infection in 3 communities in the municipality of Iriona, Colón, Honduras by January 2015. A cross-sectional descriptive study was carried out in the communities of Ciriboya, Punta Piedra and Cusuna, Colón during January 2015. A simple random sample of 145 participants was included. The diagnosis of infection of asymptomatic malaria was made by thick blood smear, conventional PCR and nested PCR. Microscopic analysis did not detect thick blood smear positive samples, resulting in a prevalence of 0.00%. The molecular approach did not detect infections either. The findings of this study agree with the pattern of previous studies in Honduras and with the progress that has been made against malaria in the country. Active case detection is recommended for interventions where malaria transmission has been reduced to low levels, and its implementation in Honduras should be part of the comprehensive strategy of elimination programs.

Keywords: *malaria, honduras, endemic diseases, Central America*

INTRODUCCIÓN

La lucha contra la malaria ha tenido un progreso considerable en el mundo. En la región de las Américas se han disminuido los casos confirmados de 1.2 millones a 390,000 en el transcurso de 15 años y la mortalidad ha sido reducida en un 37% entre el 2010-2015. En Honduras se observan tendencias similares, con reducción de los casos de más de 17,000 a 3,564 en la última década y sin muertes reportadas durante el año 2015 (WHO 2015).

Motivados por el notable éxito obtenido en los últimos años, muchos países endémicos han adoptado estrategias de eliminación (Feachem et al., 2010). En este sentido Honduras, en el marco del Consejo de Ministros de Centroamérica, se comprometió en 2013 a acompañar los esfuerzos de la iniciativa regional para la eliminación de la Malaria en Mesoamérica y la isla La Española para el año 2020 (COMISCA 2013). De los países comprometidos en esta iniciativa, tres se encuentran en fase de eliminación mientras que Honduras y otros seis están en fase de control.

Para cumplir de manera exitosa con esta meta, las estrategias deben de considerar a todos los individuos infectados por malaria en las intervenciones que se van a realizar. Por ello adquieren mayor valor e interés los esfuerzos enfocados en identificar las infecciones asintomáticas en la población, ya que se ha evidenciado que este tipo de reservorios juegan un rol importante en la persistencia de la transmisión en zonas endémicas y por ende un obstáculo para la eliminación (Peto et al., 2016). Se ha observado que estos reservorios asintomáticos están más extendidos de lo que se creía anteriormente, aún en zonas no endémicas. Estudios recientes utilizando herramientas de diagnóstico molecular han demostrado que las infecciones sintomáticas y detectables a través de la microscopía comprenden únicamente una pequeña fracción de todas las infecciones (Bousema et al., 2014). Así también, se ha propuesto que la condición de infección asintomática no es tan benigna como se pensaba, ya que está podría estar asociada a episodios recurrentes de parasitemia sintomática, anemia crónica, morbimortalidad neonatal y materna, predisposición a otras condiciones y discapacidad cognitiva (Chen et al., 2016).

La prevalencia del parásito en las poblaciones endémicas es un indicador esencial para monitorizar el progreso del control de la malaria. Tradicionalmente se ha realizado mediante microscopía por gota gruesa, que ha sido muy valiosa durante el último siglo para entender la epidemiología de la enfermedad. De igual manera en algunas zonas se utilizan tests de diagnóstico rápido para la vigilancia. Sin embargo, ambos

métodos tienen sensibilidad limitada, detectando infecciones con densidad parasitaria mayor de 10-100 parásitos por μl (Okell et al., 2012). Por esta razón las técnicas moleculares, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), han ido adquiriendo mayor relevancia debido a su mayor sensibilidad, pudiendo detectar densidades de hasta 0.01 a 10 parásitos por μl (Roth et al., 2016).

En Honduras, la incidencia de casos de malaria se concentra principalmente en dos departamentos, Colón y Gracias a Dios, que contribuyen al 74 % del total de casos del país y al 99 % de casos por *P. falciparum*. En el proceso de transición de la fase de control a la de pre-eliminación, la epidemiología de la malaria sufre cambios considerables, lo que hace que las intervenciones deban de ser más exhaustivas (Cotter et al., 2013).

El presente estudio tiene como objetivo, evaluar el grado de casos asintomáticos de malaria en tres escenarios comunitarios endémicos de la costa Atlántica del departamento de Colón en Honduras. Los productos de esta investigación contribuyen a la estrategia contra la malaria que ha definido Honduras a través de la Secretaría de Salud en una de las zonas de mayor incidencia de la enfermedad, aportando a los esfuerzos de búsqueda activa de casos asintomáticos, cuya identificación es de especial relevancia en la fase de eliminación para la toma de decisiones más efectivas en el proceso de intervención.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio: Se realizó un estudio descriptivo en una muestra de la población de las comunidades de Ciriboya, Cusuna y Punta Piedra, ubicadas en la costa del municipio de Iriona, departamento de Colón, Honduras durante enero del 2015.

Muestra y recolección de datos: Se estudiaron 145 personas, mayores de 6 meses, asintomáticas, residentes en la comunidad por al menos dos años, que no estuvieran recibiendo tratamientos antimaláricos y sin procedimientos de transfusión de hemoderivados en los últimos 4 meses. La muestra se calculó a partir de una población de 5,120 personas, utilizando un muestreo probabilístico aleatorio simple, con intervalo de confianza de 95% y un error de 8%.

La participación en el estudio fue debidamente autorizada mediante un consentimiento informado personal, escrito y firmado. Las personas fueron abordadas mediante

visitas domiciliarias, donde se realizó la toma de las muestras de sangre mediante punción capilar del dedo índice de la mano derecha. Las primeras gotas de sangre fueron utilizadas para preparar el frotis de gota gruesa para ulterior análisis microscópico y luego se extrajo sangre para cubrir al menos 1.3 cm del papel filtro Whatman® (GE Healthcare Life Sciences) para análisis molecular.

Gota gruesa: Los frotis de gota gruesa fueron teñidos con Giemsa y luego analizados microscópicamente en el Laboratorio Teasdale Corti de la Escuela de Microbiología, UNAH en Tegucigalpa. Las muestras de frotis eran declaradas negativas de infección cuando Plasmodium no era detectado con aumento de alta potencia (100x). Todas las láminas fueron analizadas por dos microscopistas independientes y un tercero cuando existían resultados discordantes.

Métodos moleculares: Se extrajo el ADN a partir de una muestra de 3 mm de sangre seca en papel filtro Whatman, que fue sumergida en 200 µl de saponina al 1% y se incubó a 4°C durante 12 horas. Se lavó 4 veces con solución salina amortiguada con fosfatos (PBS), luego se resuspendió en 5% de Chelex-100 (Bio-Rad Laboratories), incubando a 56°C durante 15 minutos y a 100°C durante 10 minutos. Se centrifugó 5 minutos a 13,000 rpm y se recuperó el ADN presente en el sobrenadante, se almacenó a 4°C para su posterior análisis.

Para la detección del genoma del parásito se utilizó una PCR única y específica para cada una de las dos especies presentes en Honduras (*P. vivax* y *P. falciparum*) utilizando como diana secuencias genómicas repetidas llamadas Pvr47 y Pfr364 (Demas et al., 2011). Las amplificaciones fueron realizadas bajo las siguientes condiciones: en 25 µl de master mix 2X (Promega Corporation), 10 pmol de los cebadores Pf 7142: 5'-GCTTTGAAGTGCATGTGAATTGTGCAC-3' y Pf 7178: 5'-CCGAAATT-CGGGTTTTAGAC-3' para *P. falciparum*; y 12.5 pmol de los cebadores Pv 7074: 5'-CAAATGTAGCATAAAAATCYAAG-3' y Pv 7175: 5'-CTGATTTTCCGCGTAACA-ATG-3' para *Plasmodium vivax*. Un total de 40 ng de ADN fue usado para todas las reacciones de PCR.

Las reacciones fueron amplificadas mediante una desnaturalización inicial a 95°C por 2 minutos, y seguidamente 25 ciclos de 95°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos y 72°C por 45 segundos, con un procesamiento final a 72°C por 5 minutos. Los amplicones fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio. El tamaño esperado de los productos fue de 220 pares de bases (pb) para *P. falciparum* y 333 pb para *P. vivax*.

El 10% de las muestras con resultados negativos luego de la PCR, fueron confirmadas mediante la realización de una nueva amplificación y mediante la utilización de un segundo protocolo de PCR anidada que tenía como diana el gen que codifica la unidad 18S ribosomal del parásito (Singh et al., 1999). Esta PCR anidada fue realizada en 50 µl conteniendo 25 µl de master mix Promega 2X, 20 pmol de los cebadores rPLU1 y rPLU5 (5'-TCAAAGATTAAGCCATGCAAGTGA-3' / rPLU5: 5'-CCTGTTGTTGCCTTAAACTYC-3') y 40 ng de ADN.

La primera PCR fue seguida de amplificaciones especie-específicas. Las mezclas para la reacción estaban compuestas de 25 µl de 2X master mix y 20 pmol de cada cebador (rFAL1/rFAL2 para *P. falciparum* y rVIV1/rVIV2 para *P. vivax*), hasta un volumen final de 50 µl. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo a 94°C por 4 minutos; 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 58°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto; y un paso de extensión final era llevado a cabo a 72°C por 4 minutos. Los tamaños observados de los amplicones fueron de 205 pb para *P. falciparum* y 107 pb para *P. vivax*. Los productos de la segunda PCR eran separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y bromuro de etidio.

Las secuencias de los cebadores son rFAL1: 5'-TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAA-ATATATT-3'; rFAL2: 5'-ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC-3'; rVIV1: 5'-CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC-3'; y rVIV2: 5'-ACTTCCAAGCCGAA-GCAAAGAAAGTCCTTA-3. Se incluyeron controles negativos y positivos en cada análisis.

Análisis de datos: Toda la información obtenida se almacenó y procesó en el sistema Excel 2013. El muestreo aleatorio simple también fue realizado utilizando este software.

Consideraciones éticas: Durante el estudio, se consideraron los principios básicos de la ética médica, autonomía, justicia, beneficencia y no maleficencia, considerándose los postulados de la Declaración de Ginebra. Cada individuo accedió a participar previo a la lectura, discusión y firma de un consentimiento informado. Se cumplieron todos los parámetros de bioseguridad para proteger en cada etapa del proceso a los participantes. El estudio fue aprobado y acompañado por el Programa Nacional de Malaria de la Secretaría de Salud de Honduras y la Dirección del Hospital Popular Garífuna de Honduras.

RESULTADOS

Fueron estudiados 145 individuos, que residían en las áreas de influencia del estudio, 13 de Ciriboya, 100 de Cusuna y 32 de Punta Piedra. El 63% de los participantes fueron mujeres. El rango de edad osciló entre 18 y 92 años con una desviación estándar de ± 26.5 , y un promedio de residencia en la comunidad de 36.8 años.

Mediante el análisis microscópico no se detectaron muestras de gota gruesa positivas para el parásito, resultando en una prevalencia de 0% ($n = 0/145$). El abordaje molecular tampoco detectó infecciones ($n = 0/145$); correspondiendo a un 100% de concordancia entre la microscopía y las técnicas moleculares.

DISCUSIÓN

En el presente estudio no se detectó la presencia de infecciones por *P. vivax* o *P. falciparum* mediante un enfoque microscópico ni a través de técnicas moleculares. En Honduras existen tres investigaciones previas que documentan la prevalencia de malaria asintomática en distintas poblaciones. En 1996 se estudió a una muestra de 319 personas residentes de Ceibita, Tocoa, Colón, quienes reportaron una prevalencia de casos de infección asintomática de 17% mediante el uso de tiras reactivas, y de 15% mediante la visualización microscópica de frotis de gota gruesa (Quintana et al., 1998). En 2000 se estudiaron 146 niños de Palacios, Gracias a Dios, en búsqueda de infección asintomática, encontrándose una prevalencia de 1.4% (2/146) de infección por *P. vivax* mediante análisis de gota gruesa (Aguilar et al., 2002). Más recientemente, durante agosto del 2014, se realizó un estudio donde participaron 1,899 personas de Puerto Lempira, Gracias a Dios, el municipio con mayor carga de casos del país, en el cual se detectó una prevalencia de infección asintomática de 0.16% mediante microscopía y 1.1% mediante PCR (Maradiaga et al., 2016). Aunque el abordaje metodológico de los distintos estudios tiene algunas variaciones, se puede observar un patrón hacia la disminución de la carga de estas infecciones y una prevalencia baja de las mismas, compatible con los hallazgos del presente estudio. Este patrón de disminución de las infecciones asintomáticas coincide con la disminución de la incidencia de casos de malaria en el país, que ha tenido una reducción del 79% en los últimos diez años (OMS 2015). La menor persistencia en este estudio puede estar explicada por varios factores, entre ellos: 1) El patrón de disminución de la incidencia de casos que también se ha registrado en el departamento de Colón, que hace una década era la región del país con mayor número de casos y ahora

ocupa el tercer lugar (SESAL 2011), 2) La menor incidencia de casos de malaria de Iruya en relación a los demás municipios de Colón, 3) La reorientación de las prioridades estratégicas de prevención y control de la malaria hacia la región Atlántica del país y 4) La implementación de intervenciones más integrales y con mayor participación de las comunidades.

A nivel internacional, dentro de los hallazgos más recientes y utilizando abordajes metodológicos similares, en El Salvador no se detectó presencia de *Plasmodium* spp por gota gruesa, PDR ni PCR en niños en edad escolar (OPS 2013); en Paraíba, Brasil se reportaron infecciones asintomáticas en 11.3% de la población infantil (Sales et al., 2011), mientras que en la zona de la Amazonia pueden llegar a ser hasta de 49.5% en una población de distintas edades de Ji-Paraná (Coura et al., 2006). En Haití, se han encontrado prevalencias en un rango de 4-41% dependiendo de la región geográfica (Elbadry et al., 2015), mientras que en Etiopía se encontró una prevalencia de 4.3% infecciones asintomáticas por *P. vivax* (Tadesse et al., 2015) y 6.8% de malaria por todas las especies (Worku et al., 2014). En Bangladesh se reportaron cifras de prevalencia de 30.7% y 14.2% mediante PCR y microscopía, respectivamente (Starzengruber et al., 2014). Un estudio regional del Sureste Asiático arrojó prevalencias de 4, 5 y 20% mediante microscopía, PDR y PCR, respectivamente (Imwong et al., 2015). A pesar de la heterogeneidad de los datos, se observa un patrón de mucho mayor prevalencia de infecciones asintomáticas en los países o zonas donde las poblaciones han tenido menos acceso a las intervenciones y donde la morbi-mortalidad ha tenido poca disminución en la última década.

El aumento de las intervenciones contra la malaria, han resultado en un descenso importante en la morbimortalidad global y local. Pero a pesar de este logro, hay evidencia de que las actuales intervenciones contra la enfermedad, por sí solas no conducirán a la eliminación de la malaria en la mayoría de escenarios y por tanto, estrategias adicionales deben de considerarse para mantener y mejorar los actuales indicadores (Lindblade et al., 2013). Avances en las técnicas de diagnóstico molecular como las utilizadas en este estudio, contribuyen a reconocer el comportamiento de las infecciones asintomáticas en humanos como potencial reservorio, ya que cuando la transmisión alcanza niveles muy bajos, se estima que las infecciones submicroscópicas causan entre 20 y 50% de la transmisión de humano a mosquito (Okell et al., 2012). Esto se torna especialmente importante, cuando se está en proceso de reorientación de los programas con miras a la eliminación.

La Detección Activa de Casos (DAC) es recomendada para intervenciones en lugares donde la transmisión de la malaria se ha reducido hasta niveles bajos (Sturrock et al.,

2013). Por lo que su implementación en Honduras, debe de ser parte de la estrategia integral de los programas de pre-eliminación y eliminación, para así poder cumplir con los acuerdos internacionales de eliminación de la malaria en la región para el año 2020 y más importante aún, alejar de manera permanente a la población del daño que esta enfermedad representa.

CONCLUSIONES

1. La nula prevalencia de casos asintomáticos de malaria descrita en este estudio se relaciona con los hallazgos regionales de nula prevalencia de personas asintomáticas en algunas zonas estudiadas y de disminución en la incidencia de casos de malaria.
2. Los hallazgos de esta investigación son compatibles con el comportamiento que ha tenido la prevalencia de casos asintomáticos a través del tiempo en la zona atlántica de Honduras.
3. El riesgo de transmisión de malaria causada por reservorios asintomáticos es nulo en las comunidades de Ciriboya, Cusuna y Punta Piedra del municipio de Iriona, lo que constituye un avance importante en el control de esta enfermedad en una zona clasificada como endémica.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a las siguientes personas e instituciones cuyo esfuerzo desinteresado en pro del desarrollo de la investigación hicieron posible y facilitaron nuestra labor: Dr. Eladio Varcарcel, Escuela Latinoamericana de Medicina (ELAM), Dr. Cheney Dolmo (ELAM), a las instituciones: Brigada Médico Cubana, Primer Hospital Popular Garífuna de Honduras, Programa Nacional de Malaria de la Secretaría de Salud, Laboratorio Nacional de Malaria. En especial, a las y los estudiantes que apoyaron la logística y la recolección de los datos: Marlon Arias, Xenia Paz, Dely Castillo, Daniela Navas, Jovanna Andrade, Enia Gómez, Maria Aguilera, Yasmín Rodezno, Tirza Viera, Daniela Torres y Moisés Castro.

Conflictos de Interés

Los autores de este trabajo declaramos que no tenemos ningún conflicto de interés

en relación a este trabajo de investigación. Asumimos toda la responsabilidad por la integridad de los datos y la exactitud de los análisis de los mismos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar CJ, Bu-Figueroa E, Alger J. (2002). Malaria: subclinical infection among school children in Palacios, Mosquito Coast. *Revista Médica Hondureña*, 70(1), 111–115.
- Bousema T, Okell L, Felger I & Drakeley C. (2014). Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. *Nature Reviews Microbiology*, 12(12), 833-840.
- Chen I, Clarke SE, Gosling R, Hamainza B, Killeen G, Magill A, O'Meara W, Price RN, Riley EM. (2016). "Asymptomatic" Malaria: A Chronic and Debilitating Infection That Should Be Treated, 13(1): e1001942.
- Consejo de Ministros de Centroamérica (COMISCA). (2013). *Declaración: Hacia la Eliminación de la Malaria en Mesoamérica y la Isla La Española en el 2020*. San José, Costa Rica: PASMO.
- Cotter C, Sturrock HJ, Hsiang MS, Liu J, Phillips AA, Hwang J, Gueye CS, Fullman N, Gosling RD, Feachem RG. (2013). The changing epidemiology of malaria elimination: new strategies for new challenges. *Lancet*, 382, 900–911.
- Coura JR, Suárez-Mutis M, Ladeia-Andrade S. (2006). A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic Plasmodium infection - a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 101(3), 229-237.
- Demas A, Oberstaller J, DeBarry J et al. (2011). Applied genomics: data mining reveals species-specific malaria diagnostic targets more sensitive than 18S rRNA. *J Clin Microbiol.*, 49(7), 2411–2418.
- Elbadry MA, Al-Khedery B, Tagliamonte MS, Yowell CA, Raccurt CP, Existe A, Boncy J, Weppelmann TA, Beau De Rochars VEM, Lemoine JF, Okech BA and Dame JB. (2015). High prevalence of asymptomatic malaria infections: a cross-sectional study in rural areas in six departments in Haiti. *Malaria Journal*, 510(14): <https://doi.org/10.1186/s12936-015-1051-2>.
- Feachem RG, Phillips AA, Hwang J, Cotter C, Wielgosz B, Greenwood BM. (2010). Shrinking the malaria map: progress and prospects. *Lancet*, 376, 1566–1578.
- Imwong M, Nguyen TN, Rupam T, Peto JT., Sue JL., Lwin KM, Suangkanarat P, et al. (2015). The epidemiology of subclinical malaria infections in South-East Asia: findings from cross-sectional surveys in Thailand–Myanmar border areas, Cambodia, and Vietnam. *Malaria Journal*, 381(14), <http://doi.org/10.1186/s12936-015-0906-x>
- Lindblade KA, Steinhardt L, Samuels A, Kachur SP, Slutsker L. (2013). The silent threat: asymptomatic parasitemia and malaria transmission. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 11(6), 623-639.
- Maradiaga A., García J, Mejía-Torres R, Escobar L, Matamoros J, Enriquez L & Fontecha GA.

- (2016). Asymptomatic Malaria Infections in an Endemic City of Honduras. *Human Parasitic Diseases*, 8, 37–41.
- Okell LC, Bousema T, Griffin JT, Ouédraogo AL, Ghani AC, Drakeley CJ. (2012). Factors determining the occurrence of submicroscopic malaria infections and their relevance for control. *Nature Communications*, 3, 1237–. <http://doi.org/10.1038/ncomms2241>.
- Organización Mundial de la Salud / Organización Panamericana de la Salud (OPS/OMS). (2013). *Prevalencia e intensidad de infección por geo-helminfos y prevalencia de portadores de malaria en escolares en El Salvador*. OPS.
- Peto TJ, Tripura R, Lee SJ, Althaus T, Dunachie S, Nguon C, Dhorda M, Promnarate C, Chalk J, Imwong M, Seidlein L, Day N, Dondorp A, White N, Lubell Y. (2016). Association between Subclinical Malaria Infection and Inflammatory Host Response in a Pre-Elimination Setting. *Public Library of Science*, 11(7): e0158656.
- Quintana M, Piper R, Boling HL et al. (1998). Malaria diagnosis by dipstick assay in a Honduran population with coendemic Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax. *Am J Trop Med Hyg*, 59(6), 868–871.
- Roth JM, Korevaar DA, Leeflang MM, Mens PF. (2016). Molecular malaria diagnostics: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 53(2), 87–105.
- Sales M C, Queiroz EO, & Paiva AA. (2011). Association between anemia and subclinical infection in children in Paraíba State, Brazil. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 33(2), 96–99.
- Singh B, Bobogare A, Cox-Singh J, Snounou G, Abdullah MS, Rahman HA. (1999). A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *Am J Trop Med Hyg.*, 60(4), 687–692.
- Starzengruber P, Fuehrer HP, Benedikt L, Kamala T, Swoboda. (2014). High prevalence of asymptomatic malaria in south-eastern Bangladesh. *Malaria Journal*, (13), <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-16>.
- Sturrock H., Hsiang MS, Cohen JM, Smith DL, Greenhouse B, Bousema T, & Gosling RD. (2013). Targeting Asymptomatic Malaria Infections: Active Surveillance in Control and Elimination. *PLoS Med*, 10(6), e1001467.
- Tadesse FG, Pett H, Baidjoe A, Lanke K, Grignard L, Sutherland C. (2015). Submicroscopic carriage of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax in a low endemic area in Ethiopia where no parasitaemia was detected by microscopy or rapid diagnostic test. *Malaria Journal*, 303(14), <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0821-1>.
- Tietje K, Hawkins K, Clerk C, Ebels, K., McGray S, Crude, LaBarre P. (2014). The essential role of infection-detection technologies for malaria elimination and eradication. *Trends in Parasitology*, 30(5), 259-266.
- Worku L, Damtie D, Endris M, Getie S, and Aemero M. (2014). Asymptomatic Malaria and Associated Risk Factors among School Children in Sanja Town, Northwest Ethiopia. *International Scholarly Research Notices*, 2014 (1): <http://dx.doi.org/10.1155/2014/303269>.
- World Health Organization. (2015). *World Malaria Report*. Geneva, Switzerland: World Health Organization.