

Pregledni rad | Review paper

## Malaria – metode dijagnostike

### Malaria – Diagnostic Methods

Josip Bago<sup>1</sup>, Hrvojkica Janković<sup>2</sup>, Suzana Bukovski<sup>3,4,5</sup>

<sup>1</sup> Zavod za javno zdravstvo Varaždinske županije, Varaždin, Hrvatska

<sup>2</sup> Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, Hrvatska

<sup>3</sup> Klinika za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, Zagreb, Hrvatska

<sup>4</sup> Fakultet za dentalnu medicinu i zdravstvo Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek, Hrvatska

<sup>5</sup> Hrvatsko katoličko sveučilište, Medicinski fakultet i Odjel za sestrinstvo, Zagreb, Hrvatska

#### Ključne riječi:

malaria  
Plasmodium  
parazitarna infekcija  
dijagnostika  
krvni razmaz  
gusta kap  
brzi dijagnostički testovi  
lančana reakcija polimeraze

#### Keywords:

malaria  
Plasmodium  
parasitic infection  
diagnostics  
blood smear  
thick smear  
rapid diagnostic tests  
polymerase chain reaction

Primljeno: 22-07-2021

Received: 22-07-2021

Prihvaćeno: 08-09-2021

Accepted: 08-09-2021

#### ✉ Autor za korespondenciju:

Josip Bago,  
Zavod za javno zdravstvo Varaždinske županije,  
Ulica Ivana Meštrovića 1, 42000 Varaždin,  
e-mail: bago.josip@yahoo.com

#### Sažetak

Malaria je još uvijek najznačajnija parazitarna infekcija na svijetu, značajan uzrok pobola i smrtnosti u endemskim zemljama te predstavlja velik rizik za putnike u te krajeve. Ključan dio u globalnoj borbi protiv malarije je mogućnost brze i točne detekcije uzročnika. Tehnološki napredak otvara nove dijagnostičke mogućnosti no, najstarija metoda, konvencionalna mikroskopska dijagnostika malarije i dalje predstavlja zlatni standard. Cilj ovog teksta je pregledati dio relevantne literature o dijagnostičkim metodama za malariju koje se najčešće upotrebljavaju u kliničkoj praksi u endemskim i neendemskim zemljama: mikroskopskoj dijagnostici, brzim antigenskim testovima (BAT), molekularnim metodama i serologiji. Također, iznosimo podatke o nekim od novijih napredaka u dijagnozi malarije.

#### Summary

Malaria remains the most important and impactful parasitic infection in the world, causing significant morbidity and mortality in endemic countries, and posing a great health risk for travellers to those areas. A major component in the global fight against malaria is the ability to detect it both quickly and accurately. Technological advancements continually provide us with new diagnostic methods, but the oldest method, conventional microscopic diagnosis of malaria, is still considered to be the gold standard. Here, we review some of the relevant literature on diagnostic methods for malaria most commonly applied in the clinical setting, both in endemic and non-endemic areas: microscopic diagnosis, rapid antigen tests (RDTs), molecular methods and serology. We also inform on some of the more recent advancements in the diagnosis of malaria.

### Uvod

Malaria je i danas najznačajnija parazitarna infekcija na svijetu unatoč tomu što je praktički eradicirana u područjima umjerene klime. Predstavlja značajan uzrok smrtnosti i pobola u tropskim područjima te kod putnika koji dolaze iz endemskih područja.<sup>[1]</sup> Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO), 2019. godine zabilježeno je 229 milijuna slučajeva zaraze i 409 000 smrtnih slučajeva, s učestalim postepenim silaznim trendom u usporedbi s prethodnim podacima.

Velika većina slučajeva, 94%, odnosi se na afrički kontinent. Od ukupnog broja infekcija čak 51% pojavilo se u samo pet afričkih država: Nigeriji, Demokratskoj Republici Kongo (DRC), Ugandi, Mozambiku i Nigeru.<sup>[2]</sup> Uzročnici malarije su obligatno parazitne jednostanične prazivotinje iz roda *Plasmodium* unutar kojeg je pet vrsta od posebnog značaja za humanu medicinu (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* i *P. knowlesi*). Karakterizira ih složeni životni ciklus koji obuhvaća kralješnjake kao domaćine i ženke komaraca roda

*Anopheles* kao vektore.<sup>[3]</sup> Ciklus započinje hranjenjem ženke komarca krvlju domaćina pri čemu dolazi do unosa sporozoit u kožu, otkud ulaze u krvotok. Sporozoit krvlju dopire do jetre i inficiraju hepatocite u kojima se odvija jetrena shizogonija, a produkt je shizont koji sadrži merozoite. Merozoiti se oslobađaju u cirkulaciju i podliježu aseksualnoj krvnoj shizogoniji. Dio krvnih merozoita podliježu gametocitogenezi pri čemu nastaju gametociti koji ubodom komarca ulaze u probavnu cijev insekta, gdje gametociti prelaze u muške i ženske gamete čijom fuzijom nastaju zigote. Zigote se transformiraju u pokretni ookinet koji migrira kroz probavni epitel i prelazi u oocistu. Unutar oociste dolazi do aseksualne sporogene replikacije, pri čemu nastaju pokretni sporozoit koji se rupturom ciste oslobađaju u žlijezde slinovnice insekta, čime se ciklus zatvara.<sup>[3]</sup>

Malaria se najčešće klinički manifestira paroksizmima febriliteta koji koreliraju s intraeritocitnim stadijima parazita (24 sata za *P. knowlesi* infekciju; 48 sati za *P. falciparum*, *P. vivax* i *P. ovale* te 72 sata za *P. malariae*).<sup>[4]</sup> Osim razdoblja febriliteta, rani simptomi su nespecifični te uključuju: umor, malaksalost, mučninu, mijalgiju, povraćanje te ortostatsku hipotenziju. Težak oblik bolesti (eng. *severe malaria*) je multisistemska bolest koja se može manifestirati raznoliko, ovisno o dobnoj skupini pacijenata. U dječjoj dobi moguće je preklapanje triju sindroma različitih prema biološkim i kliničkim karakteristikama koji uključuju: moždanu malariju (eng. *cerebral malaria*), tešku malarijsku anemiju (eng. *severe malarial anemia*) te acidozu/hiperlaktemiju koja se manifestira kao respiratorni distress. Uz to, mogu se pojaviti i drugi klinički znaci kao što su hipoglikemija, akutna bubrežna ozljeda, žutica, značajno krvarenje ili hiperparazitemija.<sup>[5]</sup> Navedeni klinički znaci malarije su nespecifični te je samo kliničkim pregledom teško postaviti dijagnozu. Potrebno je potvrditi prisutnost parazita prije početka terapije. Temelj dijagnostike, tzv. zlatni standard je pregled preparata obojenog diferencijalnom bojom svjetlosnim mikroskopom. Tom metodom moguće je diferencirati i kvantificirati uzročnika te pratiti pacijenta tijekom različitih stadija bolesti. Brzi antigenski testovi (eng. *rapid diagnostic test, RDT*) omogućili su dijagnostiku antigena iz uzoraka krvi. Rezultati su dostupni brzo, testovi su jednostavni za upotrebu i interpretaciju. Molekularni testovi detektiraju prisutnost nukleinskih kiselina u uzorcima krvi, visoko su osjetljivi i specifični. Testovi mogu diferencirati i kvantificirati uzročnika te detektirati gene povezane s antimikrobnom rezistencijom.<sup>[6]</sup> Serološke metode dokazuju prethodnu izloženost uzročniku malarije te se pretežito koriste u epidemiološkim studijama i u probiru donora krvi.

Protočna citometrija, masena spektrometrija, nuklearna magnetska rezonanca i relaksometrija magnetske rezonance metode su čija se primjenjivost u dijagnostici malarije još treba potvrditi.

Prema smjernicama SZO-a, temelj liječenja nekomplikirane malarije uzrokovane s *P. falciparum* čini kombinirana terapija artemisininom ili nekim od njegovih derivata te drugim dodatnim lijekom (eng. *artemisinin-based combination therapy, ACT*). Liječenje malarije uzrokovane s *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* ili *P. knowlesi* ovisno je o otpornosti na klorokin prisutnoj u određenom geografskom podneblju. U regijama s dobrom antimikrobnom osjetljivošću preporuča se terapija klorokinom ili ACT protokolom. Područja s visokom otpornosti na klorokin još uvijek imaju opciju liječenja ACT protokolom. Teški oblici malarije su hitno medicinsko stanje, stoga je nužna brza primjena terapije. Inicijalna terapija započinje parenteralnom ili rektalnom primjenom maksimalnih doza antimalarika koja se, nakon minimalno 24-satnog razdoblja, nastavlja primjenom oralne terapije. Alternativni izbori terapije su kombinacije artesunata i klindamicina; artesunata i doksiciklina; kinina i klindamicina te kinina i doksiciklina.<sup>[7,8,9]</sup>

Razvitak cjepiva svakako je prioritet kliničkih istraživanja zbog prevencije bolesti ili teške kliničke slike i smanjenja mortaliteta. Cjepivo RTS, S/AS01 proizvedeno metodom atenuacije sporozoit zračenjem (eng. *radiation attenuated sporozoites, RAS*) temelji se na stimulaciji proizvodnje protutijela koja se vežu na površinski protein cirkumsporozoit (eng. *circumsporozoite surface protein, CSP*) te blokiraju vezanje sporozoit na hepatocite.<sup>[10,11]</sup> SZO je u listopadu 2021. godine objavila rezultate pilot projekta provedenog u suradnji s ministarstvima zdravstva Gane, Kenije i Malavija. Tijekom dvogodišnjeg razdoblja (od 2019. godine) upotrijebljeno je 2,3 milijuna doza (4-dozni režim) kod djece starije od 5 mjeseci. RTS S/AS01 cjepivo pokazalo je smanjenje teških oblika malarije za 30% te je SZO preporučila nastavak pregovora o širenju upotrebe spomenutog cjepiva u zemljama s visokom incidencijom malarije.<sup>[12]</sup>

### Mikroskopska dijagnostika

Mikroskopska dijagnostika malarije počela se razvijati još krajem 19. stoljeća i dugogodišnji je referentni standard za dijagnozu malarije.<sup>[13,14]</sup> Široko je dostupna, brza i relativno jeftina, omogućuje identifikaciju plazmodija do razine vrste i određivanje parazitemije. Osjetljivost mikroskopske dijagnostike je dobra, limit detekcije je 5-20 parazita/μl krvi.<sup>[15]</sup> Mikroskopska dijagnostika je, međutim, zahtjevna za izvođenje i

interpretaciju. Poseban problem predstavljaju infekcije s niskom parazitemijom i konkomitantne infekcije s više vrsta plazmodija.<sup>[14]</sup> Na preciznost mikroskopske dijagnostike mogu negativno utjecati i varijabilnost u kvaliteti preparata i prisutnost artefakata koji se zabunom mogu proglasiti formama plazmodija.<sup>[16]</sup> Za kvalitetnu mikroskopsku dijagnostiku uvjet je raspoloživost dobro uvježbanog, educiranog i motiviranog laboratorijskog osoblja.<sup>[14]</sup>

Konvencionalna mikroskopska dijagnostika malarije temelji se na pregledu krvi obojene diferencijalnim bojom, najčešće metodom po Giemsi. U rutinskoj dijagnostici malarije koriste se dvije tehnike pripreme preparata: krvni razmaz i gusta kap. Tanki krvni razmaz omogućuje detaljnu vizualizaciju i diferencijaciju staničnih struktura, uključujući parazita i krvnih stanica. U usporedbi sa standardnim krvnim razmazom, mikroskopski pregled guste kapi je osjetljiviji u detekciji malarije jer su paraziti u preparatu guste kapi koncentriraniji, a malarijski pigment hemozoin izraženiji. Zato je pregled guste kapi prikladan kao metoda probira.<sup>[17,18,19]</sup> Mikroskopska dijagnostika omogućuje određivanje parazitemije. Najčešće se izražava kao postotak zaraženih eritrocita koji se dobiva brojanjem zaraženih eritrocita u određenom broju vidnih polja i dijeljenjem tog broja s ukupnim brojem eritrocita u istom broju vidnih polja. Broj parazita u mikrolitru krvi dobiva se dijeljenjem broja parazita u određenom broju vidnih polja s ukupnim brojem eritrocita (u krvnom razmazu) ili leukocita (u gustom kapi) u mikrolitru krvi, pomnoženo s brojem eritrocita (u krvnom razmazu) ili leukocita (u gustom kapi) izbrojanih u istim vidnim poljima.<sup>[20]</sup> Krvni razmaz i gusta kap rutinski se izvode u većini laboratorija u svijetu, u endemskim zemljama u sklopu nacionalnih programa kontrole i u zemljama umjerene klime za dijagnozu importiranih slučajeva.<sup>[21]</sup>

Da bi se postigla i održala preciznost mikroskopske dijagnostike potrebno je redovito održavanje opreme, standardizacija dijagnostičkog procesa i redovna unutarnja i vanjska kontrola kvalitete.<sup>[21]</sup> SZO je prepoznala vitalnu ulogu dobro uvježbanog i organiziranog laboratorijskog osoblja u globalnoj borbi protiv malarije i izdala je i s godinama unapređivala priručnike za edukaciju i obnavljanje znanja i vještina laboratorijskog osoblja (eng. *Basic malaria microscopy: learner's guide & tutor's guide*) i set smjernica za kontrolu kvalitete postupaka mikroskopiranja u dijagnostičke svrhe (eng. *WHO Malaria microscopy quality assurance manual*).<sup>[22,23]</sup> SZO provodi i program testiranja kompetentnosti u mikroskopiranju laboratorijskih djelatnika (engl. *ECAMM, External Competence Assessment of Malaria Microscopists*), koristeći standardni set od 55

testnih preparata (*WHO 55*) kao referentno mjerilo.<sup>[24]</sup> Utjecaj navedenih edukacijskih programa na kvalitetu mikroskopske dijagnostike ispitan je u nekoliko studija u endemskim zemljama. Kiggundu i suradnici demonstrirali su statistički značajno poboljšanje osjetljivosti i specifičnosti mikroskopske dijagnostike nakon provođenja trodnevnog edukacijskog programa u tri od četiri dijagnostička centra u Ugandi.<sup>[25]</sup> Poboljšanje u osjetljivosti i specifičnosti uočili su i Ohrt i sur. nakon 12-dnevnog edukacijskog programa u Centru izvrsnosti za dijagnostiku malarije u Kisumu u Keniji.<sup>[26]</sup> Moura i sur. su u tri bolnice u Angoli pokazali značajno poboljšanje teorijskog znanja i kvalitetu izrade preparata, no nisu demonstrirali statistički značajan rast osjetljivosti i specifičnosti mikroskopske dijagnostike u odnosu na lančanu reakciju polimeraze (eng. *polymerase chain reaction, PCR*) kao referentnu metodu.<sup>[27]</sup> Ovakvi programi, osim što bi mogli poboljšati preciznost mikroskopske dijagnostike malarije, mogli bi pozitivno utjecati i na povjerenje kliničara u rezultate mikroskopske dijagnostike i tako smanjiti broj nepotrebno liječenih pacijenata.<sup>[28]</sup>

Osim klasične mikroskopske dijagnostike malarije postoje i druge, rjeđe korištene metode mikroskopske dijagnostike. Upotreba fluorescentnih boja s afinitetom za nukleinske kiseline (akridin narančasta) povećava osjetljivost detekcije plazmodija, ali na račun specifičnosti (boja se veže na sve stanice s jezgrom). Fluorescentna mikroskopska dijagnostika zahtijeva skuplju specijaliziranu opremu, što dovodi u pitanje odnos koristi i cijene u usporedbi sa svjetlosnom mikroskopijom.<sup>[29]</sup> Metoda bojenja akridin narančastom prikladna je za epidemiološke studije kod asimptomatske populacije unutar endemskih područja, gdje visoka osjetljivost omogućuje detekciju niske parazitemije.<sup>[30]</sup> Detekcija malarijskog pigmenta hemozoina (produkta raspada hemoglobina) mikroskopiranjem u tamnom polju također je visoko osjetljiva metoda i koristi se u dijagnostičke svrhe u laboratorijima koji su za to opremljeni.<sup>[31]</sup> Problem ove metode mikroskopske dijagnostike kao i drugih metoda detekcije malarijskog pigmenta u dijagnostičkom kontekstu mogao bi predstavljati manjak hemozoina u ranoj (< 6h) prstenastoj formi *P. falciparum*.<sup>[32]</sup>

Posljednjih godina razvijaju se automatizirani sustavi za analizu mikroskopskih preparata na osnovi strojnog učenja. Horning i sur. vrednovali su jedan takav sustav na WHO 55 setu, postigavši točnost detekcije od 94,3% i točnost identifikacije vrste od 82,5%, ekvivalent razine kompetencije 1 i 2 prema ECAMM sustavu evaluacije laboratorijskog osoblja koje sudjeluje u mikroskopiranju uzoraka krvi na malariju. Za sada ovi sustavi nisu u rutinskoj upotrebi.<sup>[33]</sup>

## Brzi antigenski testovi

Prvi brzi antigenski testovi (BAT) na malariju počeli su se pojavljivati 90-tih godina prošlog stoljeća, uz veliku ekspanziju razvoja i proizvodnje u prvom desetljeću 21. stoljeća.<sup>[34,35]</sup> To su imunokromatografski testovi koji se temelje na formaciji kompleksa topivih antigena i monoklonskih protutijela konjugiranih s indikatorskim česticama (primjerice koloidnim zlatom). Ti imunokompleksi vežu se na protutijela-„hvatače“ fiksirana na detekcijske zone uzduž nitrocelulozne membrane na mjestu kojih nastaju golim okom vidljive detekcijske linije.<sup>[36,37,38]</sup> Za razliku od mikroskopske dijagnostike BAT-ovi su vrlo jednostavni za izvođenje i interpretaciju, ne zahtijevaju dugotrajno osposobljavanje osoblja, a daju rezultat u vrlo kratkom vremenskom periodu (oko 15 minuta).<sup>[37]</sup> Imunokromatografski BAT-ovi su kvalitativni testovi, pružaju samo informaciju o prisutnosti specifičnog antigena u uzorku u trenutku uzorkovanja te nisu korisni u slučaju potrebe određivanja broja parazita u krvi.<sup>[37]</sup>

Razvoju BAT-ova prethodio je pronalazak odgovarajućih antigena povezanih s infekcijom plazmodijima. Primijećeno je da eritrociti inficirani s *P. falciparum* razvijaju površinske protruzije u obliku ručke (eng. *knob*) u čijoj formaciji sudjeluju proteini bogati histidinom (eng. *histidine-rich protein*, HRP).<sup>[39]</sup> Dosad su kod infekcije *P. falciparum* opisani *P. falciparum knob-associated histidine-rich protein* (PfKAHRP ili PfHRP1), PfHRP2, PfHRP3 i *P. falciparum membrane-associated histidine-rich protein* (PfMAHRP).<sup>[40,41]</sup> PfHRP2 i u manjoj mjeri PfHRP3 prisutni su u samom parazitu i na površini zaraženih eritrocita, a demonstrirano je da se mogu detektirati u plazmi ljudi koji boluju od malarije.<sup>[42,43]</sup> PfHRP2 i PfHRP3 su u literaturi obuhvaćeni zajedničkim terminom *histidine rich protein 2* (HRP2). HRP2 bio je prvi antigen korišten za razvoj brzih imunokromatografskih testova i najveći broj do danas korištenih BAT-ova su HRP2 testovi ili kombinirani testovi od kojih je jedan od ciljnih antigena HRP2.<sup>[42]</sup> BAT-ovi za dijagnozu *P. falciparum* malarije temeljeni na detekciji HRP2 imaju visoku osjetljivost i nešto nižu specifičnost u usporedbi s BAT-ovima koji detektiraju parazitnu laktat-dehidrogenazu (LDH) uz napomenu da su rezultati pojedinačnih studija heterogeni.<sup>[44,45]</sup> U novijoj literaturi opisuje se razvoj ultrasjetljivih HRP2-baziranih BAT-ova (eng. *ultrasensitive rapid diagnostic tests, uRDT*) koji bi se mogli koristiti za probir asimptomatskih pacijenata s vrlo niskom parazitemijom (<100 parazita/ $\mu$ L), što je ispod praga detekcije konvencionalnim BAT-ovima i teško detektabilno mikroskopskim pregledom. Daljnja istraživanja su potrebna kako bi se utvrdila vrijednost ultrasjetljivih BAT-ova za probir

asimptomatskih nositelja plazmodija.<sup>[46]</sup> Značajan nedostatak HRP2, kao antigena, pojava je sojeva *P. falciparum* koji ne produciraju pfHRP2 i pfHRP3 zbog parcijalne ili kompletne delecije odgovarajućih gena i posljedično povišen rizik za lažno negativne rezultate.<sup>[47]</sup> Prvi takvi izolati nađeni su u endemskim područjima Perua u kojima je već prethodno opisana slabija pouzdanost BAT-ova zasnovanih na detekciji HRP2.<sup>[48]</sup> Sojevi s navedenim delecijama kasnije su pronađeni u više država Južne Amerike, Afrike i Azije.<sup>[49]</sup> Opisana je korelacija između prisutnosti reumatoidnog faktora i lažne imunokromatografske detekcije HRP2, što navodi na oprez pri dijagnozi malarije kod pacijenata s autoimunim bolestima.<sup>[50]</sup> Leshem i sur. opisali su lažno pozitivan HRP2 test kod akutne shistosomijaze uzrokovane *Shistosomom mekongi*.<sup>[51]</sup> Lažno pozitivni rezultati mogući su i kod pacijenata nakon uspješno provedene terapije zbog sporog uklanjanja antigena iz cirkulacije. Iz tog razloga brzi testovi nisu opcija za praćenje uspješnosti terapije.<sup>[52]</sup> Intrinzični nedostatak HRP2 kao dijagnostičkog cilja je njegova ograničenost na *P. falciparum*.

Parazitna laktat-dehidrogenaza (pLDH) enzim je kojeg sintetiziraju aseksualne i seksualne forme plazmodija (gametociti).<sup>[49]</sup> Proizvedeni su BAT-ovi s protutijelima na epitope pLDH specifične za *P. falciparum*, *P. vivax* i na epitope zajedničke za sve vrste roda *Plasmodium* (panspecifične).<sup>[49]</sup> *P. falciparum* pLDH (Pf-pLDH) detektirajući BAT-ovi generalno demonstriraju nešto nižu osjetljivost, ali višu specifičnost kod dijagnoze *P. falciparum* malarije u odnosu na prethodno opisane HRP2 testove, no razlike su male.<sup>[53]</sup> Pf-pLDH testovi omogućuju detekciju sojeva *P. falciparum* s delecijama gena za HRP2, zbog čega su od visoke vrijednosti u područjima gdje takvi sojevi prevladavaju.<sup>[53]</sup> Panspecifični antigeni (aldolaza i pLDH) se u BAT-ovima detektiraju samostalno ili u kombinaciji s drugim antigenima za *P. falciparum* (HRP2, Pf-pLDH) i/ili *P. vivax* (Pv-pLDH). Kombinirani testovi u slučaju pozitivnog panspecifičnog antigena, a negativnog *falciparum* – specifičnog antigena omogućuju postavljanje sumnje na infekciju nekom od drugih vrsta plazmodija, no vrijednost ovih testova u dijagnostici malarije koju ne uzrokuje *P. falciparum* je upitna zbog slabije osjetljivosti.<sup>[54]</sup> Problem predstavlja i plazmodijske koinfekcije kod kojih se zbog BAT-a pozitivnog na *P. falciparum* propusti potražiti i druge uzročnike, što može imati kliničke implikacije posebice kod koinfekcije sa *P. vivax* i *P. ovale* jer zahtijevaju terapiju primakvinom u svrhu eliminacije hipnozoita. U literaturi se ne pronalaze komercijalni BAT-ovi za specifičnu detekciju *P. ovale*, *P. malariae* i *P. knowlesi*.<sup>[55]</sup>

Zbog velikog broja komercijalnih BAT-ova koji izlaze na tržište i značajnih razlika u njihovoj kvaliteti

javila se potreba za standardiziranom vanjskom evaluacijom i postavljanjem kriterija koje testovi moraju zadovoljiti prije distribucije. Navedene kriterije objavila je SZO u dokumentu pod nazivom *Recommended selection criteria for procurement of malaria rapid diagnostic tests* iz 2018.<sup>[56]</sup> SZO od 2008. provodi cikluse testiranja BAT-ova i objavljuje rezultate na godišnjoj razini.<sup>[57]</sup>

### Molekularne metode dijagnostike malarije

Mikroskopska dijagnostika i brzi dijagnostički testovi danas čine okosnicu dijagnostike malarije u endemskim i ne-endemskim područjima. No, u vrijeme kada se raspravlja o potencijalnoj eradikaciji malarije, javlja se potreba za dijagnostičkim metodama više osjetljivosti koje bi omogućile masovni probir asimptomatskih infekcija među populacijama endemskih područja. Recentni eksplozivni razvoj tehnologije u molekularnoj dijagnostici otvara nove opcije u obliku brzih, visoko osjetljivih, specifičnih, no kompleksnih i zasad skupih dijagnostičkih metoda.

Konvencionalni PCR u dijagnostiku malarije uveden je početkom 90-tih. Ubrzo potom su razvijeni osjetljivi, ali tehnički zahtjevni ugniježđeni (*nested*) PCR s početnicama specifičnim za *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* i *P. malariae*. Tako se pojavila nova visokospecifična i osjetljiva metoda detekcije plazmodija do razine vrste i prepoznavanja miješanih infekcija.<sup>[58]</sup> Značajan pomak bio je uvođenje PCR-a u stvarnom vremenu (eng. *real time* PCR) baziranog na amplifikaciji sekvencija unutar gena za 18s ribosomsku RNA.<sup>[59]</sup> Prednost *real time* PCR-a u odnosu na konvencionalni je kraće vrijeme izvođenja testa i činjenica da ne zahtijeva postamplifikacijsku obradu tijekom koje je visok rizik od kontaminacije produkta PCR-a.<sup>[60]</sup> Metode direktnog PCR-a iz krvi ne zahtijevaju provođenje postupaka ekstrakcije nukleinskih kiselina prije amplifikacije čime još skraćuju vrijeme do rezultata.<sup>[61]</sup> Reverzna transkripcija - PCR za amplifikaciju transkripata visoko-eksprimiranih gena, primjerice 18s rRNA, ostvaruje dodatno povišenje osjetljivosti u odnosu na metode amplifikacije DNA.<sup>[62]</sup> Nova jedinstvena metoda CLIP PCR (eng. *capture and ligation probe* PCR) omogućuje detekciju RNA bez prethodne ekstrakcije, a razvijena je specifično za probir malarije u endemskim područjima.<sup>[63]</sup> Testovi bazirani na petljom posredovanom izotermnom umnažanju (eng. *loop mediated isothermal amplification*, LAMP) omogućuju amplifikaciju DNA bez potrebe za klasičnim PCR uređajem. U meta-analizi iz 2015. na osnovi podataka iz četiri studije procijenjena je njihova osjetljivost na 96% i specifičnost na 91% u usporedbi s PCR-om kao

referentnom metodom.<sup>[61]</sup> Još jedna izotermalna tehnika amplifikacije je NASBA (eng. *nucleic acid sequence-based amplification*).<sup>[64]</sup> NALFIA (eng. *nucleic acid lateral flow immunoassay*) nova je imunokromatografska metoda analize PCR produkta, razvijena kao praktična zamjena za tehnički zahtjevnju gel-elektroforezu.<sup>[65]</sup> Razvijeni su multipleks-PCR sustavi za dijagnozu malarije do vrste i paneli za usporednu detekciju većeg broja infektivnih agensa uključujući i *Plasmodium spp.*<sup>[66,67]</sup>

### Serološke metode i novije eksperimentalne metode dijagnostike malarije

Serološke metode, ELISA (eng. *enzyme linked immunosorbent assay*) i IFA (eng. *indirect fluorescent assay*) u kontekstu dijagnostike malarije koriste se uglavnom u epidemiološke svrhe i u transfuziološkom probiru. Dostupni ELISA i IFA testovi visoko su osjetljivi i specifični u detekciji protutijela na plazmodije i dokazivanju prošle izloženosti, ali ne omogućuju razlikovanje trenutne i prošle infekcije. Osim toga, u ranim fazama infekcije protutijela često nisu prisutna. Iz ovih razloga serološki testovi su od ograničene koristi u dijagnozi akutne malarije.<sup>[68,69]</sup>

Neki od automatiziranih sustava za protočnu citometriju koji se koriste u hematologiji mogu detektirati hemozoin unutar fagocita. Studije koje su ispitivale protočnu citometriju u dijagnostici malarije pokazale su osjetljivost od 49-98% i specifičnost od 82-97%. Viša osjetljivost zabilježena je u endemskim područjima. Visoka cijena nabave uređaja i varijabilna osjetljivost ne idu u prilog korištenja protočne citometrije za probir. Predložena korist ove metode je mogućnost već postojećih uređaja u bolnicama da izdvoje uzorke sumnjive na malariju kod klinički nesuspektnih slučajeva, te da se ti uzorci upute na potvrdu drugim metodama.<sup>[70]</sup> Proteomički pristup dijagnozi malarije pomoću masene spektrometrije još je u ranim fazama razvoja. Masena spektrometrija desorpcije lasera (eng. *laser desorption mass spectrometry*, LDMS), metoda koja je na velika vrata ušla u bakteriološku dijagnostiku i može detektirati hem iz hemozoina s visokom osjetljivošću i specifičnošću. Masena spektrometrija je brza i jednostavna za izvedbu i zahtijeva minimalnu količinu potrošnog materijala, što ju čini obećavajućom metodom za probir većeg broja uzoraka.<sup>[70]</sup> Od drugih eksperimentalnih metoda za dijagnozu malarije vrijedi spomenuti nuklearnu magnetsku rezonancu (eng. *nuclear magnetic resonance*, NMR) i relaksometriju magnetske rezonance (eng. *magnetic resonance relaxometry*, MRR). Obje navedene metode detektiraju hemozoin s visokom osjetljivošću.<sup>[71,72]</sup>

## Zaključak

Dijagnostika malarije ključna je komponenta globalne kampanje eradikacije malarije. S obzirom da najveći teret zaraze nose endemska područja, većim dijelom ekonomski nerazvijene zemlje Afrike, Južne i Srednje Amerike i Azije koje raspolažu s ograničenim financijskim i tehničkim sredstvima, ključna je dostupnost jednostavnih, brzih, jeftinih, osjetljivih i specifičnih dijagnostičkih metoda.

Kod dijagnostike pacijenata sa sumnjom na malariju zlatni standard je mikroskopski pregled krvnog razmaza i guste kapi.<sup>[68]</sup> On omogućuje brzu dijagnozu, kvantifikaciju parazita te vizualnu analizu morfologije, identifikaciju vrste i prepoznavanje miješanih infekcija. Mikroskopski pregled je i metoda izbora za praćenje odgovora na terapiju. Glavni nedostatak mikroskopske dijagnostike je što njena kvaliteta ovisi o dobro uvježbanom laboratorijskom osoblju. Mikroskopska dijagnostika također nije dovoljno osjetljiva za detekciju vrlo niskih parazitemija (<50/μL) kakve se nalaze kod asimptomatskih nositelja, te kao takva nije idealna za masovne probire.<sup>[73]</sup>

Brzi dijagnostički testovi korisni su u situacijama gdje mikroskopska dijagnostika i molekularne metode nisu brzo dostupne. Njihove prednosti su jednostavnost korištenja i relativno visoka osjetljivost i specifičnost u dijagnostici monoinfekcija s *P. falciparum*, no ograničene su kod detekcije drugih vrsta plazmodija i miješanih infekcija. Također, pojedine endemske lokacije imaju visoku prevalenciju *P. falciparum* s delecijama gena za HRP2 antigen, te bi u tom slučaju HRP2 testovi bili manje osjetljivi. Pozitivne rezultate BAT-a treba potvrditi mikroskopskom metodom. Brzi antigeni testovi nisu prikladni za praćenje učinka terapije zbog produžene perzistencije antigena u krvi. Nedovoljno su osjetljivi za masovni probir, osim možda u slučaju novijih ultraosjetljivih BAT-ova.

Molekularne metode općenito pokazuju najvišu osjetljivost i imaju sposobnost detekcije vrlo niskih parazitemija, čak ispod 1/μL. PCR se koristi za potvrdu identifikacije do vrste i najosjetljivija je metoda za dijagnozu miješanih infekcija.<sup>[74]</sup> Real-time PCR omogućuje kvantifikaciju parazita. Moguća je i detekcija genskih polimorfizama povezanih s rezistencijom na antimalarike.<sup>[73]</sup> Glavna ograničenja molekularnih metoda je njihova cijena i ovisnost o specijaliziranoj laboratorijskoj opremi. Obzirom da se nukleinske kiseline mogu detektirati u krvi neko vrijeme nakon provedene terapije, ne preporučuje se korištenje PCR u praćenju uspješnosti terapije.<sup>[73]</sup>

## LITERATURA:

- [1] White NJ. The Treatment of Malaria. *New Engl J Med*. 1996; 335(11):800-6.
- [2] World Health Organization. World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges. Geneva: World Health Organization; 2020. Dostupno na: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/337660>.
- [3] Cowman AF, Healer J, Marapana D, Marsh K. Malaria: biology and disease. *Cell*. 2006;167(3):610-24.
- [4] White N, Pukrittayakamee S, Hien T, Faiz M, Mokuolu O, Dondorp A. Malaria. *Lancet*. 2014;383(9918):723-35.
- [5] Mackintosh C, Beeson J, Marsh K. Clinical features and pathogenesis of severe malaria. *Trends Parasitol*. 2004; 20 (12): 597-603.
- [6] Rubio M, Bassat Q, Estivill X, Mayor A. Tying malaria and microRNAs: from the biology to future diagnostic perspectives. *Malaria J* 2016;15:167.
- [7] World Health Organization. WHO guidelines for malaria. Geneva: World Health Organization; 2021. Dostupno na: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/343751>.
- [8] Checkley A, Whitty C. Artesunate, artemether or quinine in severe *Plasmodium falciparum* malaria? *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2007;5(2):199-204.
- [9] Jones KL, Donegan S, Lalloo DG. Artesunate versus quinine for treating severe malaria. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007 Oct 17;(4):CD005967.
- [10] Casares S, Brumeanu T, Richie T. The RTS,S malaria vaccine. *Vaccine*. 2010;28(31):4880-94.
- [11] Olotu A, Fegan G, Wambua J, et al. Seven-Year Efficacy of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine among Young African Children. *New Engl J Med* 2016;374(26):2519-29.
- [12] WHO. Scientists share data from first WHO-recommended malaria vaccine [Internet]. WHO, 2021. Dostupno na: <https://www.who.int/news/item/19-10-2021-scientists-share-data-from-first-who-recommended-malaria-vaccine>
- [13] Cox F. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasit Vectors*. 2010;3(1):5.
- [14] Hawkes M, Kain K. Advances in malaria diagnosis. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2007;5(3):485-95.
- [15] Hänscheid T, Grobusch M. How useful is PCR in the diagnosis of malaria? *Trends Parasitol* 2002;18(9):395-8.
- [16] Ohrt C, Purnomo, Sutamihardja M, Tang D, Kain K. Impact of Microscopy Error on Estimates of Protective Efficacy in Malaria-Prevention Trials. *J Infect Dis* 2002;186(4):540-6.
- [17] Payne D. Use and limitations of light microscopy for diagnosing malaria at the primary health care level. *Bull World Health Organ*. 1988;66(5):621-6.
- [18] Dowling MA, Shute GT. A comparative study of thick and thin blood films in the diagnosis of scanty malaria parasitaemia. *Bull World Health Organ*. 1966;34(2):249-6.
- [19] Field JW. The morphology of malaria parasites in thick blood films; the form and distribution of pigment. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1949;43(1):49-56.
- [20] Ballard E, Wang CYT, Hien TT, et al. A validation study of microscopy versus quantitative PCR for measuring *Plasmodium falciparum* parasitemia. *Trop Med Health*. 2019; 47:49.

- [21] Chiodini P. Malaria diagnostics: now and the future. *Parasitology*. 2014;141(14):1873-9.
- [22] World Health Organization. Basic malaria microscopy, 2nd ed. Geneva: World Health Organization; 2010. Dostupno na: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44208>
- [23] World Health Organization. Malaria microscopy quality assurance manual, version 2. Geneva: World Health Organization, 2016. Dostupno na: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/204266>
- [24] Horning MP, Delahunt CB, Bachman CM, et al. Performance of a fully-automated system on a WHO malaria microscopy evaluation slide set. *Malar J*. 2021;20(1):110.
- [25] Kiggundu M, Nsohya SL, Kanya MR, et al. Evaluation of a comprehensive refresher training program in malaria microscopy covering four districts of Uganda. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;84(5):820-4.
- [26] Ohrt C, Obare P, Nanakorn A, et al. Establishing a malaria diagnostics centre of excellence in Kisumu, Kenya. *Malar J*. 2007;6:79.
- [27] Moura S, Fançonny C, Mirante C, et al. Impact of a training course on the quality of malaria diagnosis by microscopy in Angola. *Malar J*. 2014;13:437.
- [28] Zurovac D, Midia B, Ochola S, English M, Snow R. Microscopy and outpatient malaria case management among older children and adults in Kenya. *Trop Med Int Health*. 2006;11(4):432-40.
- [29] Moody A. Rapid Diagnostic Tests for Malaria Parasites. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(1):66-78.
- [30] Ochola L, Vounatsou P, Smith T, Mabaso M, Newton C. The reliability of diagnostic techniques in the diagnosis and management of malaria in the absence of a gold standard. *Lancet Infect Dis*. 2006;6(9):582-8.
- [31] Jamjoom G. Dark-field microscopy for detection of malaria in unstained blood films. *J Clin Microbiol*. 1983;17(5):717-21.
- [32] Delahunt C, Horning MP, Wilson BK, Proctor JL, Hegg MC. Limitations of haemozoin-based diagnosis of *Plasmodium falciparum* using dark-field microscopy. *Malar J*. 2014;13:147.
- [33] Horning MP, Delahunt CB, Bachman CM, et al. Performance of a fully-automated system on a WHO malaria microscopy evaluation slide set. *Malar J*. 2021;20(1):110.
- [34] Uguen C, Rabodonirina M, De Pina JJ, et al. ParaSight-F rapid manual diagnostic test of *Plasmodium falciparum* infection. *Bull World Health Organ*. 1995;73(5):643-9.
- [35] Thepsamarn P, Prayoollawongsa N, Puksupa P, et al. The ICT Malaria Pf: a simple, rapid dipstick test for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria at the Thai-Myanmar border. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1997;28(4):723-6.
- [36] Koczula K, Gallotta A. Lateral flow assays. *Essays Biochem*. 2016;60(1):111-20.
- [37] Moody A. Rapid Diagnostic Tests for Malaria Parasites. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(1):66-78.
- [38] Cunningham J, Jones S, Gatton ML, et al. A review of the WHO malaria rapid diagnostic test product testing programme (2008-2018): performance, procurement and policy. *Malar J*. 2019;18(1):387.
- [39] Leech J, Barnwell J, Aikawa M, Miller L, Howard R. *Plasmodium falciparum* malaria: association of knobs on the surface of infected erythrocytes with a histidine-rich protein and the erythrocyte skeleton. *J Cell Biol*. 1984;98(4):1256-64.
- [40] Rock E, Marsh K, Saul A, et al. Comparative analysis of the *Plasmodium falciparum* histidine-rich proteins HRP-I, HRP-II and HRP-III in malaria parasites of diverse origin. *Parasitol*. 1987;95(2):209-7.
- [41] Spycher C, Klonis N, Spielmann T, et al. MAHRP-1, a novel *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein, binds ferriprotoporphyrin IX and localizes to the Maurer's clefts. *J Biol Chem*. 2003;278(37):35373-83.
- [42] Poti K, Sullivan D, Dondorp A, Woodrow C. HRP2: Transforming Malaria Diagnosis, but with Caveats. *Trends Parasitol*. 2020;36(2):112-26.
- [43] Parra M, Evans C, Taylor D. Identification of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 in the plasma of humans with malaria. *J Clin Microbiol*. 1991;29(8):1629-34.
- [44] Li B, Sun Z, Li X, et al. Performance of pfHRP2 versus pLDH antigen rapid diagnostic tests for the detection of *Plasmodium falciparum*: a systematic review and meta-analysis. *Arch Med Sci*. 2017;3:541-9.
- [45] Mason D, Kawamoto F, Lin K, Laoboonthai A, Wongsrichanalai C. A comparison of two rapid field immunochromatographic tests to expert microscopy in the diagnosis of malaria. *Acta Tropica*. 2002;82(1):51-59.
- [46] Das S, Peck R, Barney R, et al. Performance of an ultra-sensitive *Plasmodium falciparum* HRP2-based rapid diagnostic test with recombinant HRP2, culture parasites, and archived whole blood samples. *Malaria J*. 2018;17(1):118.
- [47] Wilson M. Malaria Rapid Diagnostic Tests. *Clin Infect Dis*. 2012;54(11):1637-41.
- [48] Gamboa D, Ho M, Bendezu J, et al. A Large Proportion of *P. falciparum* Isolates in the Amazon Region of Peru Lack pfhrp2 and pfhrp3: Implications for Malaria Rapid Diagnostic Tests. *PLoS ONE*. 2010;5(1):e8091.
- [49] Verma A, Bharti P, Das A. HRP-2 deletion: a hole in the ship of malaria elimination. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(8):826-7.
- [50] Lee J, Jang J, Cho C, et al. False-Positive Results for Rapid Diagnostic Tests for Malaria in Patients with Rheumatoid Factor. *J Clin Microbiol*. 2014;52(10):3784-7.
- [51] Leshem E, Keller N, Guthman D, et al. False-Positive *Plasmodium falciparum* Histidine-Rich Protein 2 Immunocapture Assay Results for Acute Schistosomiasis Caused by *Schistosoma mekongi*. *J Clin Microbiol*. 2011; 49(6): 2331-2.
- [52] Phuong M, Lau R, Ralevski F, Boggild A. Survival analysis of diagnostic assays in *Plasmodium falciparum* malaria. *Malaria J*. 2015;14(1):350.
- [53] Mukkala AN, Kwan J, Lau R, Harris D, Kain D, Boggild AK. An Update on Malaria Rapid Diagnostic Tests. *Curr Infect Dis Rep*. 2018;20(12):49.
- [54] Abba K, Kirkham AJ, Olliaro PL, et al. Rapid diagnostic tests for diagnosing uncomplicated non-falciparum or *Plasmodium vivax* malaria in endemic countries. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;2014(12):CD011431.
- [55] Yerlikaya S, Campillo A, Gonzalez I. A Systematic Review: Performance of Rapid Diagnostic Tests for the Detection of *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium malariae*, and *Plasmodium ovale* Mono-infections in Human Blood. *J Infect Dis*. 2018;218(2):265-276.
- [56] World Health Organization. Recommended selection criteria for procurement of malaria rapid diagnostic tests. Geneva:

- World Health Organization, 2018. Dostupno na: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/259870>
- [57] World Health Organization. Malaria rapid diagnostic test performance: summary results of WHO product testing of malaria RDTs: round 1-8 (2008–2018). Geneva: World Health Organization, 2018. Dostupno na: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/276193>.
- [58] Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol.* 1993; 61(2):315-20.
- [59] Farcas G, Zhong K, Mazzulli T, Kain K. Evaluation of the RealArt Malaria LC Real-Time PCR Assay for Malaria Diagnosis. *J Clin Microbiol* 2004;42(2):636-8.
- [60] Gama B, Silva-Pires F, Lopes M, et al. Real-time PCR versus conventional PCR for malaria parasite detection in low-grade parasitemia. *Exp Parasitol.* 2007;116(4):427-32.
- [61] Roth JM, Korevaar DA, Leeflang MM, Mens PF. Molecular malaria diagnostics: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2016;53(2):87-105.
- [62] Zheng Z, Cheng Z. Advances in Molecular Diagnosis of Malaria. *Adv Clin Chem.* 2017;80:155-92.
- [63] Cheng Z, Wang D, Tian X, et al. Capture and Ligation Probe-PCR (CLIP-PCR) for Molecular Screening, with Application to Active Malaria Surveillance for Elimination. *Clin Chem.* 2015;61(6):821-8.
- [64] Oriero E, Jacobs J, Van Geertruyden J, Nwakanma D, D'Alessandro U. Molecular-based isothermal tests for field diagnosis of malaria and their potential contribution to malaria elimination. *J Antimicrob Chemother* 2014;70(1):2-13.
- [65] Mens P, van Amerongen A, Sawa P, Kager P, Schallig H. Molecular diagnosis of malaria in the field: development of a novel 1-step nucleic acid lateral flow immunoassay for the detection of all 4 human *Plasmodium* spp. and its evaluation in Mbita, Kenya. *Diagn Microb Infect Dis.* 2008;61(4):421-7.
- [66] Leski TA, Taitt CR, Swaray AG, et al. Use of real-time multiplex PCR, malaria rapid diagnostic test and microscopy to investigate the prevalence of *Plasmodium* species among febrile hospital patients in Sierra Leone. *Malar J.* 2020;19(1):84.
- [67] Bridge S, Hullsiek KH, Nerima C, et al. Evaluation of the BioFire® FilmArray® Meningitis/Encephalitis panel in an adult and pediatric Ugandan population. *J Med Mycol.* 2021; 31(3):101170.
- [68] Centers for Disease Prevention and Control. 2013. DPDx. Dostupno na: <http://www.cdc.gov/dpdx/malaria>.
- [69] Pritt BS. *Plasmodium* and babesia. U: Jorgensen JH, Carroll KC, Funke G, Pfaller MA, Landry ML, Richter SS, Warnock DW, Warnock DW, Pritt BS & Procop GW (ur). *Manual of Clinical Microbiology.* 11. izd. ASM Press, 2015:2338-56.
- [70] Hawkes M, Kain KC. Advances in malaria diagnosis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2007;5(3):485-95.
- [71] Karl S, Gutiérrez L, House MJ, Davis TM, St Pierre TG. Nuclear magnetic resonance: a tool for malaria diagnosis?. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;85(5):815-17.
- [72] Peng WK, Kong TF, Ng CS, et al. Micromagnetic resonance relaxometry for rapid label-free malaria diagnosis. *Nat Med.* 2014;20(9):1069-73.
- [73] Mathison B, Pritt B. Update on Malaria Diagnostics and Test Utilization. *J Clin Microbiol.* 2017;55(7):2009-17.
- [74] Vasoo S, Pritt B. Molecular Diagnostics and Parasitic Disease. *Clin Lab Med.* 2013;33(3):461-503.