

**UNIVERZITET U BEOGRADU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Zorica D. Dakić**

**ZNAČAJ**

**MOLEKULARNE DIJAGNOSTIKE  
U EVALUACIJI KLINIČKOG TOKA  
I ISHODA MALARIJE**

**Doktorska disertacija**

**Beograd, 2015.**

**UNIVERSITY OF BELGRADE**

**MEDICAL FACULTY**

**Zorica D. Dakić**

**THE SIGNIFICANCE OF  
MOLECULAR DIAGNOSTICS  
IN THE EVALUATION OF THE  
CLINICAL COURSE  
AND OUTCOME OF MALARIA**

**Doctoral Dissertation**

**Belgrade, 2015**

**MENTORI:**

**Dr Milorad Pavlović**, redovni profesor u penziji  
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

**Dr Olgica Đurković-Đaković**, naučni savetnik  
Institut za medicinska istraživanja, Univerzitet u Beogradu

**ČLANOVI KOMISIJE:**

**Dr Sanja Mitrović**, redovni profesor  
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

**Dr Mijomir Pelemiš**, redovni profesor  
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

**Dr Nataša Miladinović Tasić**, vanredni profesor  
Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu

**DATUM ODBRANE:** \_\_\_\_\_

Ova doktorska disertacija urađena je u Nacionalnoj referentnoj laboratoriji za toksoplazmozu INSTITUTA ZA MEDICINSKA ISTRAŽIVANJA Univerziteta u Beogradu, u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije: „*Kontrola infekcije apikompleksnim patogenima: od novih mesta delovanja leka do predikcije*“ (III41019), kojim rukovodi dr Olgica Đurković-Đaković.



***ZAHVALNICA***

## ZAHVALNICA

U realizaciji ove doktorske teze imala sam značajnu podršku i pomoć, stoga želim da ovde to pomenem.

Neizmernu zahvalnost dugujem dr Olgici Đurković-Đaković, naučnom savetniku, koja me je angažovala kao saradnika na projektu čiji je rukovodilac i time omogućila finansijsku potporu ove teze. Prenoseći na mene nesvakidašnji radni entuzijazam, nesebičnom profesionalnom podrškom, savetima i sugestijama usmeravala je moj rad ka uspešnoj realizaciji teze.

Posebnu zahvalnost i poštovanje dugujem Prof. dr Miloradu Pavloviću, svom mentoru i učitelju, najiskrenijem savetodavcu, a pre svega prijatelju, koji je verovao u mene i usmerio moj profesionalni put ka ovoj inspirativnoj temi doktorske teze.

Zahvaljujem se dr Vladimiru Ivoviću jer me je uveo u svet molekularne dijagnostike i kontinuirano i savetodavno pratio moj praktični rad u realizaciji ove teze. Zahvaljujem se dr Ivani Klun na stručnoj pomoći tokom izrade teze, naročito na smernicama prilikom statističke analize upoređivanja dijagnostičkih testova kao i dr Mariji Vujančić za stručnu pomoć i sugestije tokom izrade teze.

Zahvaljujem se svim članovima Komisije Prof. dr Sanji Mitrović, Prof. dr Nataši Miladinović Tasić, a posebno Prof. dr Mijomiru Pelemišu, koji mi je otvorio profesionalna vrata i bodrio me na dosadašnjem profesionalnom putu i tokom izrade teze.

Studentkinji Medicinskog fakulteta *Karolinska* u Stokholmu Moniki Đokić zahvaljujem za mladalački entuzijazam koji je unela u deo zajedničkog praktičnog rada, a posebno za pomoć u realizaciji provere naših rezultata u Švedskoj.

Dr Lidiji Lavadinović sa Klinike za infektivne i tropske bolesti u Beogradu zahvaljujem za nesebičnu pomoć u prikupljanju kliničkih podataka, a sestriinskom timu Odeljenja izolacije na čelu sa VMS Milkom Čehić i timu hematološke laboratorije na čelu sa dr Radicom Dunjić za pomoć u prikupljanju uzoraka. Takođe se zahvaljujem dr Nikoli Mitroviću za završnu statističku obradu podataka kao i svojim saradnicima na Odseku za parazitologiju koji su vršili prijem uzoraka u mom odsustvu.

Na kraju, veliku zahvalnost dugujem mojoj porodici na pomoći i razumevanju koje su mi pružili.

***REZIME***

# ZNAČAJ MOLEKULARNE DIJAGNOSTIKE U EVALUACIJI KLINIČKOG TOKA I ISHODA MALARIJE

Zorica Dakić

## REZIME

**Uvod:** Malarija je najznačajnija parazitska infekcija u svetu. Procena je da je 2012. godine bilo 207 miliona slučajeva malarije sa 627.000 smrtnih ishoda u endemskim područjima, posebno u tropskim i subtropskim regionima (97 zemalja). Brza i pouzdana dijagnoza malarije predstavlja osnovu za primenu odgovarajuće terapije i povoljan terapijski ishod. Zlatni standard u dijagnostici malarije je još uvek mikroskopija, mada je s jedne strane subjektivna a s druge, posebno u određenim kliničkim situacijama, nedovoljno osetljiva metoda. Otuda je veliki pomak u dijagnostici predstavljalo uvođenje molekularnih tehnika, za koje je pokazano da imaju veću osetljivost i specifičnost, ali nije do kraja jasan njihov stvarni klinički značaj.

**Cilj:** Cilj ovog rada je procena kliničkog značaja real-time PCR-a (qPCR) u dijagnostici malarije, posebno u slučaju submikroskopske malarije, kao i da se ispita klinička upotrebljivost praćenja DNK-nemije za procenu efekta antimalarične terapije.

**Metodologija:** U istraživanje je uključeno 109 ispitanika koji su boravili u malaričnim područjima, kod kojih je dijagnostika malarije vršena na Odseku za parazitologiju na Klinici za infektivne i tropske bolesti u Beogradu od jula 2010. do maja 2013. godine. Kod svih ispitanika prvo je rađena mikroskopija a potom skrining qPCR gde je kao ciljani gen korišćen visoko konzervirani region 18S rRNK gena. Pozitivni uzorci su potom ispitivani specijes-specifičnim qPCR-om za identifikaciju četiri vrste roda *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* i *P. malariae*.

**Rezultati:** Malarija je dijagnostikovana kod 45 simptomatskih bolesnika, od kojih je kod 42 mikroskopski potvrđena. Kod ostala tri (6,7%) bolesnika, dijagnoza je postavljena indirektno, na osnovu adekvatnog terapijskog odgovora.

Uzorci svih 109 ispitanika podvrgnuti su ispitivanju skrining qPCR-om. Pozitivan rezultat dobijen je kod 51 ispitanika, i to kod svih sa mikroskopskim nalazom parazita, ali i kod dva bolesnika sa submikroskopskom malarijom, četiri bolesnika sa nedavno lečenom malarijom i kod tri kod kojih je bila moguća unakrsna pozitivnost sa drugim patogenima ili kontaminacija.

Analitička osetljivost skrining qPCR-a bila je 0,04 parazita/ $\mu$ L, a specifičnost 100%. Za specijes-specifični qPCR, analitička osetljivost bila je 6 parazita/ $\mu$ L za *P. falciparum*, 0,30 parazita/ $\mu$ L za *P. vivax*, 0,13 parazita/ $\mu$ L za *P. ovale* i za *P. malariae* 0,09 parazita/ $\mu$ L. Slaganje između rezultata mikroskopije i specijes-specifičnog qPCR-a u pogledu identifikacije vrsta bilo je 73,3%, a najbolje stvarno slaganje od 90,6% pokazano je za *P. falciparum*. Polovina svih slučajeva neslaganja poticala je od pogrešno identifikovane vrste roda *Plasmodium* pri mikroskopskom pregledu. Korelacija kvantifikacije parazita pomoću skrining qPCR-a i mikroskopije bila je niska (Pirsonov koeficijent korelacije  $r=-0,442$ ,  $p=0,009$ ,  $r^2=0,195$ ).

Analiza uzastopnih uzoraka pojedinačnih pacijenata pokazala je, po očekivanju, da se u toku lečenja malarije DNK-nemija (određivana skrining qPCR-om) održavala značajno duže (srednje vreme trajanja 7,9 dana) nego mikroskopska parazitemija (2,2 dana) ( $P<0,001$ ). Dugo održavanje DNK-nemije umanjuje njen klinički značaj za praćenje terapijskog efekata jer nije moguće razlučiti da li je detektovana DNK poreklom od vijabilnih ili nevijabilnih različitih stadijuma šizogonije ili gametocita.

**Zaključak:** U zaključku, rezultati ovog istraživanja su pokazali da qPCR može biti veoma dragocena metoda u dijagnostici malarije, posebno za detekciju slučajeva sa niskom parazitemijom, za preciznu kvantifikaciju parazitemije, kao i za pouzdano određivanje *Plasmodium* sp. Otuda bismo preporučili uvođenje molekularne dijagnostike u rutinsku kliničku primenu, i predlažemo uključivanje molekularnih tehnika zasnovanih na PCR-u, u kombinaciji sa konvencionalnim dijagnostičkim metodama u postojeći dijagnostički algoritam, posebno u određenim kliničkim situacijama. Na kraju, i u epidemiološkom smislu, u cilju sprečavanja uspostavljanja autohtone transmisije malarije, skrining qPCR može biti koristan za skrining povratnika iz tropskih i subtropskih područja.

**KLJUČNE REČI:** *malarija, vrste roda Plasmodium, dijagnostika, molekularna detekcija, kvantitativni real-time PCR, mikroskopija, poređenje, parazitacija*

**Naučna oblast:** Parazitologija

**Uža naučna oblast:** Molekularna dijagnostika

**UDK broj:** 577.21:616.936-078(043.3)

## ***SUMMARY***

# THE SIGNIFICANCE OF MOLECULAR DIAGNOSTICS IN THE EVALUATION OF THE CLINICAL COURSE AND OUTCOME OF MALARIA

Zorica Dakić

## SUMMARY

**Introduction:** Malaria is globally the most important parasitic disease affecting the population in 97 countries. In 2012, 207 million cases and 627.000 deaths occurred in malaria-endemic regions, concentrated in the tropics and subtropical areas. A prompt diagnosis with accurate identification of species is crucial for adequate treatment. Conventional microscopic diagnosis, although still the gold standard, is highly subjective, depending on the skill of the microscopist. This has been overcome by molecular methods, which are constantly being improved for increased sensitivity and specificity.

**Objective:** This study aimed to investigate the use of quantitative (q) real-time PCR as a confirmatory method for the diagnosis of malaria in diagnostically uncertain cases. Further aims included investigation of whether qPCR could be used for quantification of parasite density and for how long parasite DNA is detectable in patients receiving antimalarial therapy.

**Methodology:** The study group included 109 individuals after their return from tropical and subtropical areas, tested for malaria in the Parasitological Laboratory at the Hospital for Infectious and Tropical Diseases in Belgrade between July 2010 and May 2013. Patient blood samples were first examined by microscopy and tested for the presence of the parasite 18S rRNA gene by screening qPCR. All positive samples were subsequently analysed by species-specific qPCR for the detection of four *Plasmodium* species, including *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* and *P. malariae*.

**Results:** Malaria was diagnosed in 45 patients, all of which were clinically suspected of malaria. In 42 (93.3%), the diagnosis was based on microscopy, and three (6.7%) were



patients with submicroscopic malaria (SMM), in whom the diagnosis was based on the favorable effect of antimalarials administered in clinically suspected patients.

All 109 individuals were screened by qPCR, which was positive in 51, including all cases with microscopic confirmation of malaria, two with SMM, four with recently treated malaria and three that were probable instances of cross-contamination. The analytical sensitivity of screening qPCR was 0.04 parasites/ $\mu$ L and the analytical specificity was 100%.

Species-specific qPCR showed an analytical sensitivity of 6 parasites/ $\mu$ L for *P. falciparum*, 0.3 parasites/ $\mu$ L for *P. vivax*, 0.13 parasites/ $\mu$ L for *P. ovale* and, for *P. malariae* 0.09 parasites/ $\mu$ L. The agreement between the results of species-specific qPCR and microscopy was 73.3%, of which for *P. falciparum* infections it was as high as 90.6%. One half of the instances of disagreement were due to a misdiagnosis of the *Plasmodium* sp. by microscopy.

Quantification by qPCR showed low correlation (Pearson's correlation coefficient  $r=-0,442$ ,  $p=0,009$ ,  $r^2=0,195$ ) with parasitemia determined by microscopy. In patients receiving anti-malarial treatment, parasite DNA was detected (by screening qPCR) for a significantly ( $P<0.001$ ) longer period of time (mean 7.9 days) than parasitemia by microscopy (mean 2.2 days). The fact that a positive qPCR result does not differentiate among the DNA of live parasites, residual DNA of destroyed asexual blood stage parasites and circulating gametocytes limits the clinical significance of qPCR for monitoring of the treatment effect.

**Conclusion:** In conclusion, this study showed that qPCR may be useful as a method complementary to microscopy, particularly in cases of low parasitemia and SMM, and for species determination, especially in non-*P. falciparum* cases where most instances of misdiagnosis occur. Combining molecular with conventional diagnosis seems currently the best diagnostic approach and including PCR-based diagnosis into the diagnostic algorithm in use in Serbia may be recommended in routine clinical diagnostic work. In addition, qPCR may also be included into the epidemiological surveillance of returning travelers.

**KEY WORDS:** *malaria, Plasmodium species, diagnostics, molecular detection, quantitative real-time PCR, microscopy, comparison, parasitemia*

**Area:** Parasitology

**Subarea:** Molecular diagnostics

**UDK number:** 577.21:616.936-078(043.3)

## ***SADRŽAJ***

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. EPIDEMIOLOGIJA MALARIJE .....	2
1.1.1. EPIDEMIOLOGIJA MALARIJE U SRBIJI .....	5
1.2. ŽIVOTNI CIKLUS PARAZITA RODA <i>Plasmodium</i> .....	6
1.3. KLINIČKE KARAKTERISTIKE MALARIJE.....	8
1.4. LEČENJE MALARIJE.....	11
1.5. DIJAGNOSTIKA MALARIJE.....	12
1.5.1. MIKROSKOPIJA.....	13
1.5.2. BRZI ANTIGENSKI TESTOVI.....	14
1.5.3. SEROLOGIJA.....	15
1.5.4. MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA MALARIJE.....	15
<b>2. CILJ RADA</b> .....	20
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	22
3.1. DIZAJN ISTRAŽIVANJA.....	23
3.2. MATERIJAL.....	24
3.2.1. MESTO I VREMENSKI PERIOD ISTRAŽIVANJA.....	24
3.2.2. ISPITANICI.....	24
3.2.3. EPIDEMIOLOŠKI, KLINIČKI I HEMATOLOŠKI PODACI.....	25
3.2.4. UZORKOVANJE KRVI ZA KONVENCIONALNU I MOLEKULARNU DIJAGNOSTIKU.....	25
3.3. METODE.....	26
3.3.1. MIKROSKOPIJA.....	26
3.3.1.1. Uzorkovanje, bojenje i mikroskopija gustih kapi i razmaza periferne krvi.....	26
3.3.1.1.a. Priprema predmetnih stakala.....	26
3.3.1.1.b. Pravljenje gustih kapi i razmaza periferne krvi.....	27
3.3.1.1.c. Bojenje gustih kapi i krvnih razmaza po Gimzi.....	27
3.3.1.1.d. Mikroskopija gustih kapi i krvnih razmaza .....	28
3.3.1.1.e. Određivanje parazitemije plazmodijuma .....	32

3.3.2. BRZI ANTIGENSKI TEST ZA DETEKCIJU HRP2 ANTIGENA	
<i>P. falciparum</i> .....	32
3.3.3. MOLEKULARNE METODE.....	32
3.3.3.1. Ekstrakcija DNK.....	32
3.3.3.2. Kvantitativni real-time PCR za detekciju roda <i>Plasmodium</i> (skrining qPCR) .....	33
3.3.3.3. Kvantitativni real-time PCR za detekciju vrsta roda <i>Plasmodium</i> (specijes-specifični qPCR).....	35
3.3.3.4. Analitička osetljivost i specifičnost kvantitativnog real-time PCR-a.....	37
3.3.3.5. Eksterna kontrola kvaliteta dobijenih rezultata.....	37
3.3.3.6. Kvantifikacija parazitemije.....	37
3.3.3.7. Statistička analiza rezultata.....	38
3.3.3.8. Odobrenje Etičkog komiteta.....	39
<b>4. REZULTATI</b> .....	40
4.1. DEMOGRAFSKE, EPIDEMIOLOŠKE, KLINIČKE I LABORATORIJSKE KARAKTERISTIKE ISPITANIKA.....	41
4.2. KLASIFIKACIJA ISPITANIKA NA OSNOVU MIKROSKOPSKE DIJAGNOSTIKE.....	45
4.3. ANALIZA REZULTATA DIJAGNOSTIKE MALARIJE PO METODAMA.....	46
4.3.1. REZULTATI DOBIJENI KONVENCIONALNIM METODAMA.....	46
4.3.1.1. Rezultati mikroskopije.....	46
4.3.1.2. Rezultati brzog antigenskog testa.....	47
4.3.2. REZULTATI MOLEKULARNIH METODA U DIJAGNOSTICI MALARIJE.....	48
4.3.2.1. Rezultati qPCR-a za detekciju roda <i>Plasmodium</i> (skrining qPCR).....	48
4.3.2.1.a. <i>Validacija testa</i> .....	48
4.3.2.1.b. <i>Rezultati skrining qPCR-a u ispitivanoj populaciji</i> .....	49
4.3.2.2. Rezultati qPCR-a za detekciju vrsta <i>Plasmodium</i> spp. (specijes-specifični qPCR).....	49
4.3.2.2.a. <i>Validacija testa</i> .....	49
4.3.2.2.b. <i>Rezultati specijes-specifičnog qPCR-a u ispitivanoj populaciji</i> .....	50

4.3.2.3. Analitička osetljivost qPCR-a.....	52
4.3.3. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA DIJAGNOSTIČKIH METODA PRIMENJENIH ZA DIJAGNOSTIKU MALARIJE.....	54
4.3.4. ANALIZA USPEŠNOSTI PRIMENJENIH METODA U DIJAGNOSTICI MALARIJE.....	59
4.3.4.1. Rezultati poređenja metoda u dijagnostici malarije.....	60
4.3.4.2. Rezultati poređenja metoda u dijagnostici malarije po vrstama roda <i>Plasmodium</i> .....	63
4.3.4.2.a. Rezultati poređenja metoda za identifikaciju <i>P. falciparum</i> .....	63
4.3.4.2.b. Rezultati poređenja metoda za identifikaciju <i>P. vivax</i> .....	65
4.3.4.2.c. Rezultati poređenja metoda za identifikaciju <i>P. ovale</i> .....	66
4.3.4.2.d. Rezultati poređenja metoda za identifikaciju <i>P. malariae</i> .....	66
4.4. UPOREDNA ANALIZA TRAJANJA PARAZITEMIJE I DNK-nemije..	67
4.4.1. KVANTIFIKACIJA PARAZITEMIJE I KORELACIJA PARAZITEMIJE MERENE MIKROSKOPIJOM I SKRINING qPCR-om.....	72
4.4.2. DINAMIKA PARAZITEMIJE <i>P. falciparum</i> U TOKU ANTIMALARIČNE TERAPIJE.....	73
4.5. KLINIČKO-EPIDEMIOLOŠKE KARAKTERISTIKE BOLESNIKA SA MALARIJOM.....	75
4.5.1. DEMOGRAFSKE I EPIDEMIOLOŠKE KARAKTERISTIKE BOLESNIKA SA MALARIJOM.....	75
4.5.2. KLINIČKO-LABORATORIJSKE KARAKTERISTIKE BOLESNIKA SA MALARIJOM.....	79
4.5.3. RELAPSI I REKRUEDESCENCIJE MALARIJE.....	83
4. 6. DISTRIBUCIJA GAMETONOŠTVA U PROCENI RIZIKA ZA PONOVNO USPOSTAVLJANJE MALARIJE.....	84
<b>5. DISKUSIJA.....</b>	<b>86</b>
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>121</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>125</b>

***UVOD***

## 1. UVOD

Malarija je jedna od najstarijih bolesti sa kojima se čovek suočava i najznačajnija parazitska infekcija u svetu (1), sa složenom transmisijom koja se odvija u interakciji parazita, vektora, prijemčivog domaćina i sredine. Ovo je najučestalija tropska bolest, sa visokim morbiditetom i mortalitetom i sledstvenim ogromnim ekonomskim i socijalnim značajem.

Iako je u poslednjih 50 godina značajno smanjena geografska teritorija zahvaćena malarijom, kontrola je sve teža. Ponovno javljanje malarije je sve učestalije u regionima iz kojih je parazit ranije eradikovano ili u kojima je incidencija bila značajno smanjena (2, 3, 4, 5). Razlozi su mnogobrojni i uključuju globalne klimatske promene, ekološke promene pod uticajem čoveka koje favorizuju održavanje i širenje populacije komaraca, multirezistenciju parazitskih vrsta kao i masovne migracije, izazvane konfliktima ili porastom turističkih i poslovnih putovanja iz i u malarična područja.

Malarija je izlečiva bolest ako se na vreme prepozna i dijagnostikuje (6). Sa aspekta sprečavanja ponovnog uspostavljanja transmisije, pouzdana i pravovremena dijagnostika predstavlja značajnu kariku u lancu prevencije.

### 1.1. EPIDEMIOLOGIJA MALARIJE

Uzročnici malarije predstavnici su roda *Plasmodium* (*P.*) i od preko 250 vrsta ovog roda samo pet je odgovorno za malariju čoveka. Biološki vektor plazmodijuma su ženke komaraca roda *Anopheles* (7). Čovek se inficira ubodom zaraženih ženki komaraca kojim unose sporozoite, infektivne oblike parazita. Malarija je vezana za vodena staništa vektora, pre svega tropskih i subtropskih regiona sveta, gde visoke temperature pogoduju vektorima i obezbeđuju kompletiranje razvoja plazmodijuma u ženki komarca.

Poznato je preko 400 vrsta komaraca roda *Anopheles* (*A.*) ali samo 30-ak vrsta imaju vektorski kapacitet za prenošenje malarije (8). Dominantni vektori malarije u Evropi i na Srednjem istoku su *A. atroparvus*, *A. labranchiae*, *A. messeae*, *A. sacharovi*, *A. sergentini* i *A. superpictus* (9).



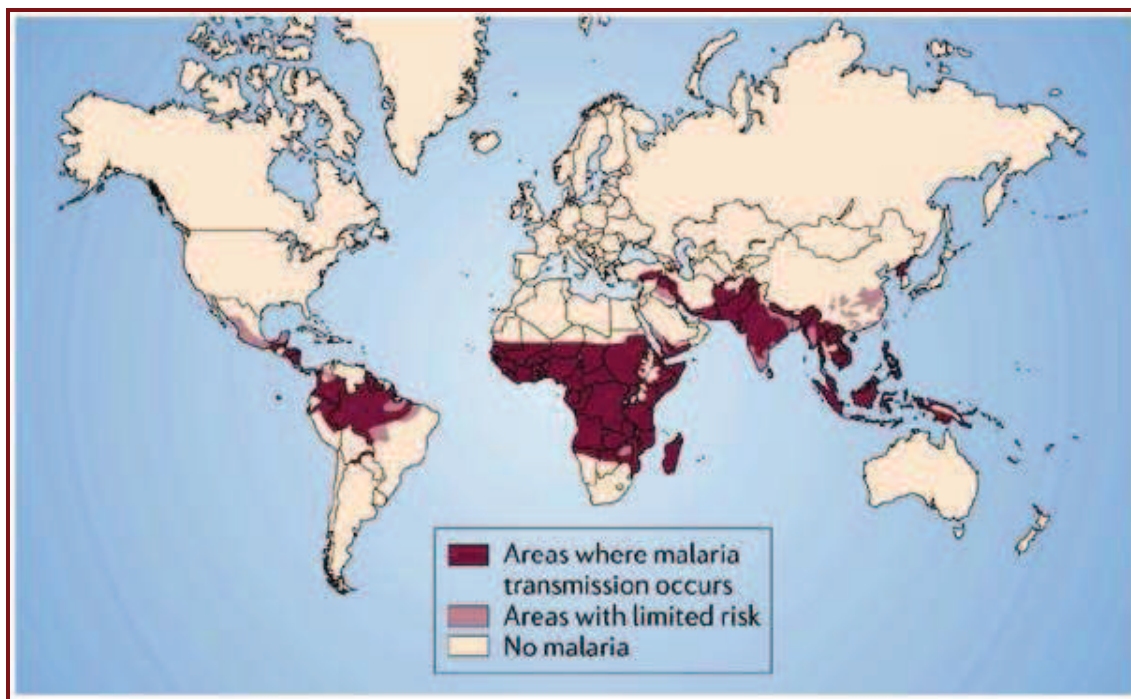
Transmisija malarije dešava se u 97 zemalja sveta. Procenjuje se da je 3,4 milijarde ljudi pod rizikom a 1,2 milijarde pod visokim rizikom od malarije. 2012. godine je bilo 207 miliona slučajeva malarije sa oko 627.000 smrtnih ishoda. Oko 90% smrtnih slučajeva desi se u podsaharskoj Africi, pre svega u Nigeriji i DR Kongo. 77% svih smrtnih ishoda dešava se kod dece mlađe od pet godina. Između 2000. i 2012. godine globalna incidencija malarije snižena je za 29%, a u Africi za 31%, dok je globalna stopa smrtnosti snižena za 45%, a u Africi za čak 49% (8).

Intenzivna poslovna i turistička komunikacija sa endemskim regionima, kao i priliv imigranata, uslovljavaju brojnost importovanih slučajeva malarije, naročito u zemljama zapadne Evrope. Najviše laboratorijski potvrđenih importovanih slučajeva malarije 2010. godine zabeleženo je u Francuskoj (n=2.438), Italiji (n=674), Nemačkoj (n=617), Španiji (n=346), Belgiji (n=213) i Portugalu (n=44) (1). U Evropi je prijavljeno i 255 slučajeva autohtone malarije i to u Gruziji (n=1), Azerbejdžanu (n=3), Tadžikistanu (n=13), Turskoj (n=218) i Grčkoj (n=20) (8).

Bitan aspekt importovane malarije je ne samo broj obolelih i umrlih, već i mogućnost ponovnog unošenja u zemlje iz kojih je iskorenjena ali u kojima su i dalje prisutni vektori. Rizik od ponovnog uspostavljanja transmisije malarije na terenima gde je ona eradikovana procenjuje se na osnovu "malariogenog potencijala" koji čine receptivnost, infektivnost i vulnerabilnost. Receptivnost je definisana prisustvom, gustom i biološkim karakteristikama vektora, infektivnost stepenom osetljivosti vektora za različite vrste plazmodijuma tj. mogućnošću kompletiranja sporogoničnog ciklusa u komarcu, a vulnerabilnost brojem prisutnih nosilaca gametocita u posmatranom području (10, 11, 12).

Importovani slučajevi malarije u uslovima globalnog zagrevanja obavezuju na budnost i prevenciju. Visoke temperature stvaraju pogodne uslove za preživljavanje vektora i kompletiranje sporogoničnog ciklusa u njima preuzimanjem gametocita plazmodijuma. Slučajevi sporadične autohtone transmisije malarije zabeleženi su u pojedinim delovima Evrope, npr u Italiji, na Korzici i u Španiji (2, 4, 5), dok je u Grčkoj ponovo uspostavljeno epidemijsko javljanje (3). Naime, nakon eradikacije 1974. godine godišnje je beleženo po 20 - 50 importovanih slučajeva. Od 1991. počelo je prijavljivanje retkih autohtonih slučajeva, a od 2009. godine uspostavljena je transmisija *P. vivax* u Lakoniji, području sa dosta vodnih kanala, pa je u periodu od 2009. do 2012.

zabeleženo ukupno 73 slučaja (2009. - 7, 2010. - 4, 2011. - 42, 2012. – 20 slučajeva). Lokalni vektori preuzeli su *P. vivax* gametocite od imigranata iz Pakistana i Avganistana koji su obavljali poljoprivredne radove tokom leta (3).



**Slika 1.** Distribucija malarije u svetu

Izvor:

[http://www.nature.com/nrmicro/journal/v4/n9\\_supp/fig\\_tab/nrmicro1525\\_F2.html](http://www.nature.com/nrmicro/journal/v4/n9_supp/fig_tab/nrmicro1525_F2.html)

Vrste roda *Plasmodium* imaju različitu geografsku distribuciju i učestalost. *P. falciparum* i *P. vivax* su najšire rasprostranjene vrste, *P. malariae* i *P. ovale* ređe (13, 14), dok je *P. knowlesi* ograničen na jugoistočnu (JI) Aziju (37).

*P. falciparum* široko je rasprostranjen u tropskim i subtropskim područjima i izaziva veliki broj kliničkih slučajeva. Najveću prevalenciju *P. falciparum* ima u podsaharskoj Africi, Novoj Gvineji i na ostrvu Hispanjola, dok je *P. vivax* najzastupljeniji u južnoj i JI Aziji, Americi i zapadnom Pacifiku. Ove dve vrste su podjednako zastupljene na Indijskom podkontinentu, u istočnoj Aziji i Okeaniji (13, 14).

*P. vivax* ima globalnu distribuciju, jer je sem tropskih i subtropskih područja značajno zastupljen i u umerenim klimatskim područjima. Duga inkubacija (i do 8 - 10

meseci) objašnjava zašto ova vrsta može biti endemska i u područjima sa dugom, hladnom zimom. Procena je da godišnje od malarije izazvane ovom vrstom oboli 90 - 120 miliona ljudi. Trenutno najveća ekspanzija *P. vivax* malarije beleži se u Severnoj Koreji, sa rizikom da se proširi na Kinu i Južnu Koreju (16).

Vrsta *P. ovale* zastupljena je u većini zemalja podsaharske Afrike, JI Azije i Indijskog podkontinenta (17, 18, 19), sa prevalencijom od čak 15% u ruralnim delovima Nigerije (20) i Papua Nove Gvineje (21).

*P. malariae* ima nisku prevalenciju ali globalnu distribuciju, koja se poklapa sa distribucijom *P. falciparum*. Raširen je širom podsaharske Afrike, JI Azije, Indonezije i ostrva u zapadnom Pacifiku, a u J. Americi u području Amazona (22, 23).

*P. knowlesi* je prvi put opisan 1931. kod dugorepih makaki majmuna u Singapuru, a prve infekcije ljudi zabeležene su 1965. i 1971. godine u Maleziji, ukazujući na njegov zoonotski kapacitet (24, 25). Vulnerabilno područje za transmisiju ove vrste proširilo se iz Malezije na šire područje JI Azije i poklapa se sa distribucijom vektora, zoofagnih komaraca grupe *A. leucosphyrus*, *A. latens* i *A. hackeri* (15, 24, 25). Distribucija *P. knowlesi* u šumskim pojasevima usloвила je importovanje ove vrste preko eko turista u zapadnu Evropu (26, 27, 28).

### 1.1.1. EPIDEMIOLOGIJA MALARIJE U SRBIJI

U bivšoj Jugoslaviji malarija je iskorenjena 1964. god., što je i Svetska zdravstvena organizacija (SZO) zvanično potvrdila 1974. god. Od tada, u Srbiji se beleže samo importovani slučajevi. Zbog prisustva importovane malarije, potencijalnih vektora i velikih vodnih prostora u priobalju Save i Dunava pogodnih za održavanje *Anopheles* spp., SZO je ovo područje proglasila prijemčivim za malariju (29). Većina putnika sa sumnjom na malariju javlja se na Kliniku za infektivne i tropske bolesti (u daljem tekstu: Klinika) Kliničkog centra Srbije (KCS), a dijagnostika se obavlja na Odseku za parazitologiju KCS gde je od 2001. do 2009. god. 2.981 putnik ispitan na malariju (30). Malarija je dijagnostikovana kod 102 bolesnika (6 - 16 godišnje) i uglavnom je bila importovana iz Afrike (92,2%). Dominantna vrsta bio je *P. falciparum* (n=78), sam (n=70) ili u mešanim infekcijama sa *P. vivax* i *P. malariae*. *Plasmodium* nije detektovan u 11 slučajeva (10,7%) klinički suspektih na malariju, niti kod

asimptomatskih putnika. U međuvremenu je došlo do porasta broja dijagnostikovanih slučajeva importovane malarije, tako ih je npr 2011. bilo 24.

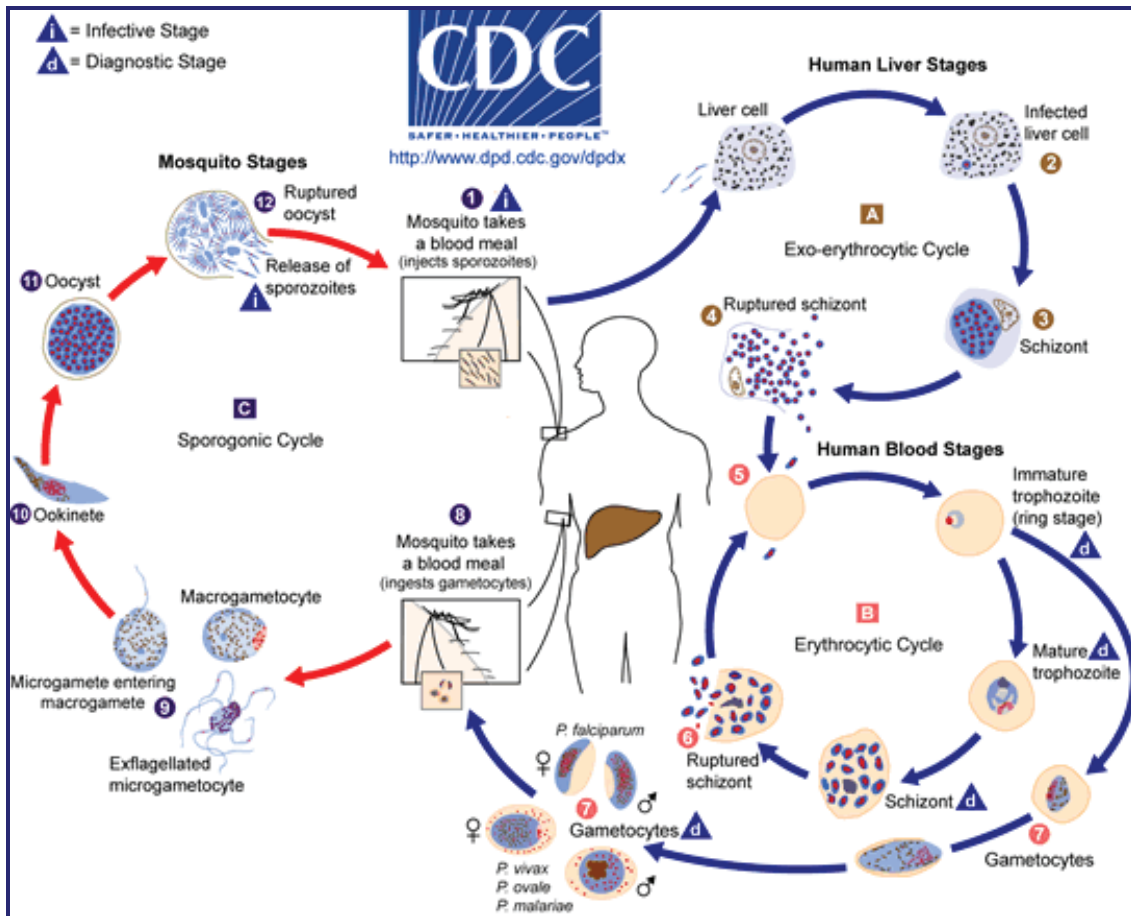
## 1.2. ŽIVOTNI CIKLUS PARAZITA RODA *Plasmodium*

Poznato je preko 250 vrsta roda *Plasmodium* koje mogu parazitirati kod različitih životinja, uključujući primare, glodare, ptice i gmizavce. Taksonomski, paraziti malarije pripadaju klasi Haemosporidea, porodici Plasmodiidae i rodu *Plasmodium*. Uzročnici malarije čoveka su *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax*, *P. ovale* a od nedavno je i zoonotska vrsta *P. knowlesi*, zbog pojava epidemija u JI Aziji, priznata kao peti izazivač malarije čoveka (15).

Životni ciklus roda *Plasmodium* sastoji se od seksualne i aseksualne faze. Seksualna faza, oplodjenje i sporogonija, odvija se u vektoru, ženki anofeličnog komarca i traje 10 do 18 dana. Ženka polaže jaja na 2 do 3 dana za šta joj je neophodan krvni obrok. Nakon sporogonije pri sledećem krvnom obroku ženka inficira narednog domaćina, unoseći svojom salivom infektivne oblike sporozoite.

Aseksualna deoba, šizogonija, odvija se u organizmu čoveka i obuhvata ekstraeritrocitnu fazu u hepatocitima koja traje 5 - 15 dana, i eritrocitnu fazu.

Infekcija čoveka počinje ubodom ženke komarca roda *Anopheles* koja inkulira sporozoite plazmodijuma iz svoje salive. Sporozoiti 30 - 40 minuta po inokulaciji ulaze u hepatocite gde se dele i diferenciraju u merozoite čiji broj varira u zavisnosti o vrste plazmodijuma i kreće se od 2000 (*P. malariae*) do 40.000 (*P. falciparum*). Prskanjem hepatocita dolazi do oslobađanja merozoita u krvotok (10).



**Slika 2.** Šematski prikaz životnog ciklusa plazmodijuma (Izvor: [www.dpd.cdc.gov/dpdx](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx))

Legenda: i - infektivni stadijum; d - dijagnostički stadijum; 1 - komarac uzimajući kvni obrok ubodom čoveka unosi infektivne oblike, sporozoite; A - ekstraeritrocitni ciklus (u jetri): 2 - ulazak u hepatocite; 3 - šizonti, 4 - prskanje šizonata; B - eritrocitni ciklus; 5 - ulazak merozita u eritrocit i šizogonija u njima (nezreli trofozoiti, zreli trofozoiti, mladi šizonti, zreli šizonti); 6 - prskanje šizonata, oslobađanje merozita koji parazitiraju nove eritrocite; 7 - stvaranje gametocita u eritrocitima, njihovo sazrevanje do makrogametocita i mikrogametocita; C - sporogonija; 8 - komarac krvnim obrokom unosi gametocite; 9 - eksflagelacija mikrogametocita i oplodjenje ulaskom mikro u makrogametocit; 10 - stvaranje ookineta; 11 - stvaranje oociste; 12 - prskanje oociste i oslobađanje sporozoita

Životni ciklusi vrsta roda *Plasmodium* se delimično razlikuju. Faza šizogonije u eritrocitu (Er) traje 48 sati kod *P. vivax*, *P. falciparum* i *P. ovale*, 72 sata kod *P. malariae* a 24 sata kod *P. knowlesi* (25). Merozoiti prodrli u Er koriste hemoglobin (Hgb) domaćina za svoje preživljavanje. Formiraju najpre mlade trofozoite prstenastog oblika, a potom zrele trofozoite, koji se razvijaju u mlade a potom u zrele šizonte. Zreli šizonti ispunjeni merozoitima dovode do prskanja Er što za posledicu ima anemiju a oslobođeni merozoiti inficiraju nove Er.

U toku aseksualne reprodukcije, posle nekoliko generacija merozoita, pojedini paraziti se konvertuju u seksualne forme, muške i ženske gametocite, čiji život traje nekoliko dana. Stvaranje gametocita nije obavezno, čak ni u slučaju kada se bolesnik ne leči. Broj gametocita u perifernoj krvi nije uvek u srazmeri sa brojem aseksualnih parazita. S obzirom na to da su gametociti odgovorni za pojavu i održavanje transmisije plazmodijuma, njihova brojnost i sposobnost da inficiraju komarca vrlo je važan faktor u epidemiologiji malarije (31, 32, 33).

### 1.3. KLINIČKE KARAKTERISTIKE MALARIJE

Prijemчивost čoveka za nastanak infekcije plazmodijumom i razvoj bolesti je različita. Kod srpaste anemije postoji otpornost na malariju (34), odsustvo *Duffy* antigena na Er u izvesnoj meri štiti od *P. vivax* malarije (35), dok stanovnici malaričnih područja stiču imunitet. U trudnoći, koja je inače praćena stanjem fiziološke imunosupresije, malarija se ispoljava težom kliničkom slikom, anemijom majke, mogućom (kongenitalnom) transplacentarnom infekcijom ploda i prevremenim porođajem (36).

Klinička slika malarije i farmakološka efikasnost antimalarika povezani su sa vrstom roda *Plasmodium* i kompleksnim životnim ciklusom u organizmu čoveka.

Inkubacija obuhvata vreme od uboda komarca do početka ispoljavanja bolesti i varira od 7 do 30 dana, ali i znatno duže. Najkraća inkubacija, sa retkim izuzecima, vezuje se za *P. falciparum* (37), dok *P. malariae* može imati dugu inkubaciju merenu i decenijama (38).

Malarični napad predstavlja skup paroksizama između kojih se javljaju kraći ili duži afebrilni intervali. Paroksizmi su posledica istovremenog prskanja velikog broja Er i oslobađanja merozoita u krv (39). Klasičan paroksizam obuhvata "hladni" stadijum (traje 15 - 60 minuta, manifestuje se osećajem hladnoće, jeze i drhtavice), "vreli" stadijum (traje dva do tri sata, manifestuje se skokom temperature i preko 40°C, glavoboljom, povraćanjem), i stadijum znojenja, kada se profuznim znojenjem temperatura naglo vraća na normalu. Sledi opšta malaksalost i potreba za snom nakon čega se oboleli oseća dobro.



Simptomi su posledica oslobođenih parazitskih toksina koji indukuju makrofage na produkciju citokina (40). Simptomatologija malarije je na početku infekcije nespecifična i uobičajeno se ispoljava simptomima sličnim influenci što otežava kliničko prepoznavanje. U početku ruptura inficiranih Er nije sinhronizovana, ali se posle nekoliko dana uspostavlja sinhronizacija što se manifestuje intermitentnom febrilnošću na 24, 48 ili 72 sata, zavisno od vrste (10, 22, 41). *P. vivax* i *P. ovale* parazitiraju samo u mladim Er, čije je učešće u populaciji Er 2%, te je teorijski maksimum nivoa parazitemije 2%. *P. malariae* parazitira u starim Er kojih ima 1 - 2% te je i kod ove vrste maksimalni nivo parazitemije 2%, ali najčešće ispod toga, uobičajeno do 5.000 parazita/ $\mu$ L (par/ $\mu$ L) krvi. Najmalignija vrsta, *P. falciparum*, parazitira u svim stadijumima Er te parazitemija može dostići i do 40 - 50%. Ciklus aseksualnog umnožavanja *P. knowlesi* traje svega 24 sata što za posledicu ima visoku parazitemiju (24, 42).

Najveći broj slučajeva malarije se klasifikuje kao umerena ili nekomplikovana malarija. Međutim, malarija može dovesti do anemije, splenomegalije, trombocitopenije, blage žutice, uvećane jetre, ubrzanog disanja ali i težih komplikacija i smrtnog ishoda (22, 43, 44, 45). Za teške slučajeve malarije praćene sindromom toksičnog šoka odgovorni su citokini TNF-alfa, IFN-gama, IL-1 i IL-6. Kliničke studije su pokazale visok nivo TNF-alfa kod obolelih od malarije, sa pikom u cirkulaciji u toku šizogonije i paroksizama. TNF-alfa može biti kritični medijator patogeneze cerebralne malarije (46).

Ako se pojave simptomi multiorganskog oštećenja, uz parazitemiju preko 5%, malarija se smatra teškom (45). Ovo se posebno često dešava kod *P. falciparum* malarije, gde u kratkom periodu može doći do ozbiljnih oštećenja organa kada se razvijaju cerebralna malarija i koma, akutno oštećenje bubrega, edem pluća, akutni respiratorni distress sindrom (ARDS), žutica, dijareja, kardiovaskularni kolaps i šok, teška anemija, hemoglobinurija, metabolička acidoza i abnormalna koagulacija / trombocitopenija (39, 45, 47). *P. falciparum* je odgovoran za većinu smrtnih slučajeva (48). Kod ove vrste šizogonija se odvija u krvnim sudovima unutrašnjih organa. Visoka parazitemija može dovesti do teške anemije. Na površini Er inficiranih ovom vrstom stvaraju se "ispupčenja", koja čine proteini bogati histidinom, kojima se Er vezuju za vaskularni endotel i za druge Er. Grupisane ćelije dovode do adherencije Er za

endotelne ćelije što izaziva poremećaj mikrocirkulacije, uzrokujući mikrotromboze a potom i nekroze, dovodeći do oštećenja mozga (cerebralna malarija), bubrega i drugih organa (47).

Iako *P. vivax* retko daje komplikacije, one se mogu javiti (ARDS, ruptura slezine, cerebralna malarija) i završiti fatalno, što uz mogućnost relapsa i porasta rezistencije na glavne antimalarike ovu vrstu čini vrlo aktuelnom (13, 16).

*P. ovale* retko izaziva ozbiljne komplikacije u vidu rupture slezine, teške anemije i ARDS-a (49).

Kliničke manifestacije izazvane vrstom *P. knowlesi*, koji može dostići visoku parazitemiju i do 27% (42), variraju od umerenih do teških, a bolest se može završiti spontanim izlečenjem ali i fatalno (24). Kod febrilnih povratnika iz šumskih pojaseva JI Azije klinička sumnja na *P. knowlesi* postavlja se na osnovu teže kliničke slike i više parazitemije nego što se očekuje kod *P. malariae*, temperaturnih skokova na 24 sata i prisustvom atipičnih oblika plazmodijuma (15).

S druge strane, iako su slučajevi *P. vivax* i *P. ovale* malarije uopšteno govoreći benigniji, obe ove vrste plazmodijuma mogu u hepatocitima formirati uspavane forme, tzv. hipnozoite, koji osim primarne infekcije (obično unutar 2 - 3 meseca od infekcije) mogu i mesecima ili godinama kasnije dovesti do recidiva (ponovne pojave bolesti). Ova vrsta recidiva označava se kao relaps i predstavlja epizodu infekcije koja nastaje posle prolaska kompletne eritrocitne faze, ulaskom u cirkulaciju dotad uspavanih parazita preeritrocitne faze. Novija istraživanja pokazala su da *P. ovale* daje relapse češće nego što se ranije mislilo, i to u periodu između 2 meseca i 2 godine nakon inicijalne infekcije (50). Hipnozoiti se ne nalaze u razvoju *P. falciparum* i *P. malariae*. Međutim, kod *P. falciparum* infekcije, mogući su takođe recidivi koji se označavaju kao rekrudescencije, koje predstavljaju pogoršanje simptoma kod bolesnika kod kojih je u krvi zaostao nizak nivo parazita što klinički i parazitološki nije bilo uočljivo. Za *P. malariae* karakteristično je da submikroskopska infekcija može perzistirati decenijama.

Među hematološko - biohemijskim parametrima, najznačajniji indikator malarije je trombocitopenija koja se detektuje kod blizu polovine obolelih. Značajan podatak je i porast laktat dehidrogenaze (LDH) dok je broj Er na početku infekcije nepromenjen (51, 52).



## 1.4. LEČENJE MALARIJE

Izbor terapije u lečenju malarije zavisi od težine bolesti, vrste roda *Plasmodium*, geografskog područja zaražavanja i s njim povezane otpornosti uzročnika na lekove, životne dobi bolesnika i eventualne trudnoće. Najčešće korišćeni antimalarici su hlorokvin, kinin, meflokin, artemizininski preparati i kombinacija atovakvona i progvanila (Malarone®) (53). Na efikasnost lekova utiču brojni faktori kao što su osetljivost soja *Plasmodium* spp., koncentracija leka u krvi, postojeći imunitet koji ubrzava sniženje parazitemije, funkcija slezine, životna dob, anemija i eventualne koinfekcije (54). Efikasnost primenjene terapije i pojava eventualne rezistencije procenjuju se na osnovu praćenja parazitemije. Nivo parazitemije u prvih nekoliko sati nakon započinjanja antimalarične terapije zavisi od stadijuma populacije parazita. Ukoliko je većina parazita vrlo mlada šizogonija je još u toku i za očekivati je da će se novoparazitirani Er pojaviti ubrzo nakon primene terapije, što se manifestuje stabilnom ili povišenom parazitemijom, uprkos efikasnom lečenju (55). Dominacija zrelih parazita u perifernoj krvi odražava veću biomasu sekvstriranih Er, a samim tim i težu bolest. Mikroskopska procena zrelosti parazita pruža važne patofiziološke i prognostičke informacije što je od naročitog značaja kod teške *P. falciparum* malarije. U većini slučajeva parazitemija se prati svakodnevno, nekad na 2 - 3 dana, ali ima preporuka da se u cilju stvaranja jasnog profila kinetike parazitemije praćenje vrši dvaput dnevno (55).

Kinin, kinidin, hlorokvin, meflokin i artemizininski preparati deluju samo na parazite eritrocitnog stadijuma. Mogu im se dodati i tetraciklini i klindamicin, koji mada sami za sebe imaju slabije parazitocidno dejstvo, u kombinaciji deluju sinergistički. Pirimetamin i primakvin deluju na intrahepatične forme parazita. Trenutno najefikasniji antimalarik, koji uništava parazite malarije u svim stadijumima razvoja, jeste Malarone®, koji se koristi za prevenciju ili lečenje akutne malarije u područjima sa hlorokvin i meflokin rezistentnim *P. falciparum*-om (53).

U nekomplikovanim slučajevima malarije krv se ne uzima više puta dnevno te nije moguće uočiti kolebanja parazitemije po satima. Kod parazita osetljivih na hlorokvin, smanjenje broja parazita je efikasnije nego kod primene kinina zbog šireg dijapazona stadijuma parazita na koje deluje. Obeležje artemizininskih preparata je brža

redukcija parazitemije, zbog čega su pogodni za kombinovanje sa antimalaricima koji deluju sporije (ACT - *artemisinin-based combination therapy*) (56). To postižu ubijanjem prstenastih formi parazita koji zaostaju u Er i sa njima bivaju uklonjeni iz cirkulacije, čime se sprečava sazrevanje i sekvestracija. Rezistencija na artemizininke preparate koja se pojavila u zapadnoj Kambodži (8) ispoljava se usporenom redukcijom parazitemije, slično efektu lečenja kininom, što ukazuje na otpornost mladih trofozoita na artemizinine. Rezistencija na artemizininke preparate procenjuje se na osnovu prolongirane parazitemije nakon 72 sata od započinjanja terapije (55). U lečenju *P. knowlesi* infekcije za sada se efikasnom pokazala kombinacija hlorokvina sa primakvinom (24).

## 1.5. DIJAGNOSTIKA MALARIJE

Brza i pouzdana dijagnoza su ključne reči za svaki suspektan slučaj malarije. Rana dijagnoza je osnov uspešne terapije i prevencije teških komplikacija. Tačno određivanje vrsta *Plasmodium*-a čini osnovu za primenu odgovarajuće terapije. Kod malarije, naročito izazvane *P. falciparum*-om, značajno je određivanje i praćenje nivoa parazitemije kao indikatora težine bolesti i uspešnosti primenjene terapije (57).

Cilj svih dijagnostičkih metoda je detekcija parazita u perifernoj krvi. Njihova uspešnost zavisi od vrste plazmodijuma, nivoa parazitemije, hemioprofilakse, započete terapije, prisustva gametocita, imuniteta domaćina, kao i kvaliteta testova. Dijagnostika malarije uključuje mikroskopiju, brze dijagnostičke testove (*rapid diagnostic test* - RDT), serologiju i molekularne metode zasnovane na reakciji lančane polimerizacije (*polymerase chain reaction* - PCR) (57, 58, 59, 60).

Do nedavno, mikroskopija je bila jedino dostupna metoda. Iako predstavlja zlatni standard u dijagnostici malarije, ima i brojne nedostatke. Pre svega, zahteva iskusnog parazitologa. Još su začetnici malariologije isticali potrebu i značaj obuke parazitologa (61).

Osim tehničkih ograničenja, različiti činioci kao što su niska parazitemija, mešane infekcije sa dominacijom jedne vrste, asimptomatske infekcije imunizovane populacije sa niskom parazitemijom, i već započeto lečenje ili subdoziranje lekova, mogu otežati mikroskopsku dijagnostiku (62). Stoga se radi pouzdanije dijagnostike

poslednjih godina intenzivno razvijaju i unapređuju brzi testovi, serološke i molekularne metode.

### 1.5.1. MIKROSKOPIJA

Iako je prošlo više od sto godina od kada je u dijagnostiku malarije uvedena tehnika mikroskopskog pregleda razmaza periferne krvi, i uprkos napretku ostvarenom zahvaljujući uvođenju i razvoju sve kvalitetnijih brzih testova a danas i molekularnim tehnologijama, mikroskopija ostaje zlatni standard u dijagnostici malarije. Gotovo 40% globalnih epizoda malarije u 2008. godini odnosilo se na pet afričkih zemalja uključujući Tanzaniju, u kojoj se godišnje beleži 16 miliona kliničkih slučajeva i 70.000 smrtnih ishoda (63), a svega 12 - 20% slučajeva se parazitološki potvrdi (64). Ovo je uobičajeno u afričkim zemljama gde se generalno manje od 20% slučajeva malarije potvrdi (1). Broj potvrđenih slučajeva malarije porastao je sa procenjenih 10% u 2010. na 14% u 2012. godini. Oko 188 miliona bolesnika ispitano je mikroskopski 2012. godine, od čega samo u Indiji preko 120 miliona bolesnika (8).

Mikroskopija je relativno brza i jeftina metoda, čija osetljivost i specifičnost zavise od kvaliteta uzorka i bojenja i veštine parazitologa. Prag osetljivosti mikroskopskog pregleda je 50 - 500 (prosečno 100), a u najboljim svetskim laboratorijama i samo 5 - 20 par/ $\mu$ L krvi. Potrebno je pregledati 200 - 500 vidnih polja pre nego što se uzorak proglasi negativnim (62, 65). Nedostaci mikroskopije su objektivna nedetektabilnost niskih parazitemija (submikroskopska malarija - SMM) (66, 67), nepouzdana određivanje vrste (morfološka sličnost pojedinih vrsta i stadijuma parazita, varijacije unutar vrsta, izmenjena morfologija parazita nakon započete terapije, loš kvalitet razmaza i/ili bojenja), teško uočavanje manje zastupljene vrste u mešanim infekcijama, nedetektabilna parazitemija usled sekvenciranja *P. falciparum*, kao i lažna pozitivnost nakon terapije (mikroskopski vidljivi ali oštećeni paraziti) (68). Još od ranije poznato je da se bojenjem gustih kapi u toku ispiranja izgubi 60 - 90% parazita (69), što je poseban problem kod niskih parazitemija.

Paraziti malarije vizuelizuju se mikroskopskim pregledom bojenih gustih kapi i krvnih razmaza (70). Bojenje preparata vrši se različitim tehnikama bojenja a vreme bojenja zavisi od boje, i iznosi za bojenje po Gimzi 20 - 30 min, za bojenje po Lajšmanu

45 min a za brzu metodu po Fildu 10 sek (71). Mikroskopskim pregledom se određuju vrsta roda *Plasmodium*, stadijum parazita i nivo parazitemije, što su značajni parametri u izboru terapije. Vrsta se određuje na osnovu veličine i oblika parazitiranih Er i morfologije plazmodijuma. Mikroskopskim pregledom se može uočiti parazitski pigment fagocitovan od strane leukocita (Le) i time proceniti težina bolesti (72). Preparati se mogu godinama čuvati što omogućava kasniju kontrolu kao i edukaciju kadrova.

Mikroskopija je još uvek metoda izbora kod akutne malarije. Dužina mikroskopiranja zavisi od nivoa parazitemije i iskustva parazitologa. Kod niske parazitemije (< 100 par/ $\mu$ L krvi) neophodna je duža mikroskopija, u trajanju od bar 10 - 15 minuta pre nego što se preparat proglasi negativnim (62, 65). Metoda zahteva veliki angažman i stručnost parazitologa i otuda je izrazito subjektivna. Nažalost, u ruralnim delovima podsaharske Afrike u područjima endemske malarije nema dovoljno obučanih parazitologa, što povećava rizik od pogrešne dijagnoze kao i povećan rizik za pojavu teške malarije (57, 62, 73).

### 1.5.2. BRZI ANTIGENSKI TESTOVI

U cilju eliminisanja nedostataka mikroskopije SZO promoviše primenu brzih testova (68). Brzi testovi su imunohromatografski testovi kojima se detektuju parazitski antigeni u krvi. Prednost je brzo dobijanje rezultata (15 - 20 minuta), jednostavnost izvođenja i očitavanja. Kao ciljni antigeni koriste se histidinom obogaćeni protein 2 (HRP2) specifičan za *P. falciparum* (74), panspecifična *Plasmodium* aldolaza zajednička za sve četiri glavne vrste plazmodijuma i parazitska laktat dehidrogenaza (pLDH) koja može biti panspecifična, zajednička za sve četiri vrste ili specifična za pojedine vrste roda *Plasmodium*. pLDH luče samo vijabilni plazmodijumi što je korisno za praćenje efikasnosti terapije (74, 75, 76).

Prvom generacijom brzih testova detektovan je samo HRP2 antigen *P. falciparum*, hidrosolubilni antigen koji se oslobađa i iz intaktnih Er i koga luče aseksualni stadijumi i mladi gametociti svih sojeva *P. falciparum*, i koji je pokazao odličan dijagnostički potencijal. Međutim, pokazalo se da ovi testovi povremeno daju i

lažno negativne rezultate zbog prozone, polimorfizma HRP2 ili delecije, kao i lažno pozitivne rezultate zbog prisustva reumatoidnog faktora (68).

Novim generacijama brzih testova uz upotrebu monoklonskih antitela kombinuju se različiti ciljni antigeni uz uobičajenu zastupljenost HRP2 antigena. Iako se stalno usavršavaju, brzi testovi za sada omogućavaju pouzdanu dijagnostiku samo za *P. falciparum* i donekle *P. vivax*, dok su nedovoljno pouzdani za identifikaciju ostalih vrsta. Nedostaci brzih testova su visok prag osetljivosti od 50 par/ $\mu$ L, ograničena detekcija mešanih infekcija, nemogućnost određivanja parazitemije i dugotrajno prisustvo HRP2 antigena u krvi što onemogućava praćenje efikasnosti terapije (53, 77). Obim prodaje brzih testova u endemskim zemljama povećan je sa 88 miliona u 2010. na 205 miliona u 2012. godini, a i na globalnom nivou njihova primena povećana je sa 44% na 64%. Postoje brojni brzi testovi, a SZO prati njihove performanse i objavljuje rezultate analiza (1).

### **1.5.3. SEROLOGIJA**

Indirektan pristup u otkrivanju infekcije zasniva se na detekciji specifičnih antitela plazmodijuma serološkim metodama kojima se može pratiti izloženost parazitima malarije i potvrditi ranija infekcija. Sa manjim ili većim uspehom u primeni su test indirektne imunofluorescencije (IIF), test indirektne hemaglutinacije (IHA) i imuno-enzimske metode (*enzyme linked immunosorbent assay* - ELISA), kojima se dokazuju specifična IgG antitela. Otuda serološke metode ne služe za detekciju akutne infekcije jer se antitela razvijaju tek nakon 10 - 14 dana, ali su veoma korisne u epidemiološkim istraživanjima kao i u transfuziologiji, za skrining davalaca krvi. U Africi se serologija uspešno koristi za praćenje promena u intenzitetu transmisije (78).

### **1.5.4. MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA MALARIJE**

Devedesetih godina prošlog veka započeto je uvođenje molekularnih metoda zasnovanih na PCR-u za detekciju specifičnih sekvenci DNK plazmodijuma iz pune krvi (79, 80). Ove metode su visoko specifične i osetljive, jer omogućuju detekciju 1 - 5 (pa i manje) parazita na  $\mu$ L krvi kao i genotipizaciju (62, 81). Već je kvalitativnim PCR-

om povećana osetljivost u odnosu na mikroskopski pregled i do 100 puta, dok je daljim razvojem uvedena i kvantitativna dijagnostika, a unapređeni su i identifikacija vrsta roda *Plasmodium* i detekcija mešanih infekcija.

PCR je lančana reakcija u kojoj je eksponencijalna amplifikacija DNK omogućena upotrebom enzima DNK polimeraze u ponovljenim ciklusima zagrevanja i snižavanja temperature sa ciljem denaturacije, hibridizacije i ekstenzije (82). Denaturacija je prvi korak kojim posle zagrevanja reakcione smeše koja sadrži DNK, termostabilnu Taq polimerazu, prajmere i nukleotide, nastaju dva komplementarna lanca DNK. Potom, snižavanjem temperature, prajmeri se vezuju za DNK (hibridizacija) i konačno povišenjem temperature polimeraza dodaje komplementarne nukleotide i dolazi do elongacije (ekstenzija) komplementarnog DNK lanca (82).

Princip malarija-specifičnog PCR-a bazira se na amplifikaciji izabranog parazitskog regiona, male subjedinice 18S rRNK gena, koji se smatra idealnim za identifikaciju roda i vrste *Plasmodium* kao i za kvantifikaciju plazmodijuma (83). Parazitski 18S rRNK gen se razlikuje od humanog na 630. poziciji lociranoj između visoko konzerviranih sekvenci što omogućava dizajniranje prajmera i proba kojima će se obezbediti razlika između humanog i parazitskog rRNK gena (84).

U molekularnoj dijagnostici malarije primenjuju se različite metode zasnovane na PCR-u. U prvoj fazi uvođenja molekularnih metoda za dijagnozu malarije razvijen je kvalitativni a potom i *nested* PCR, koji su se pokazali korisnim za dijagnostiku malarije kod niske parazitemije i kod mešanih infekcija (59, 85, 86, 87). Obe metode su takođe pogodne za detekciju niskog nivoa asimptomatskih infekcija kod stanovnika endemskih područja (85). Ove metode su kvalitativne i uključuju manipulaciju nakon umnožavanja, čime se povećava rizik od kontaminacije.

Značajan napredak u razvoju metoda zasnovanih na PCR-u predstavljalo je uvođenje kvantitativnog PCR-a u realnom vremenu tj. qPCR (*quantitative real-time polymerase chain reaction*). qPCR daje informacije o količini DNK prisutnoj u uzorku određivanjem broja DNK kopija formiranih posle svakog ciklusa (88). Princip je konjugacija boje u novu DNK što omogućava kvantifikaciju originalno prisutne. Reakcija se kontinuirano posmatra, otuda i naziv "u realnom vremenu". Za merenje DNK u svakom trenutku koriste se fluorescentne probe (TaqMan probe, SYBR Green ili molekularni svetionik - *molecular beacon*). TaqMan probe su kratki DNK fragmenti

sa fluorescentnom reporter bojom na jednom kraju i prigušivačem (*quencher*) na drugom kraju DNK šablona. Prigušivač emituje svetlost velike talasne dužine (crvene boje) i njime prikriva signal male talasne dužine (zelene boje) koji emituje reporter. Proba se vezuje za ciljnu DNK, nakon čega Taq polimeraza sintetiše komplementaran lanac počevši od prajmera, usput uklanjajući vezanu TaqMan probu koja joj se nađe na putu. Tako se odvajaju i reporter i prigušivač. Oslobođena reporter boja koja se više ne detektuje od strane prigušivača daje fluorescenciju koja se kvantifikuje i predstavlja novoformiranu DNK (88).

qPCR omogućava osetljivu i specifičnu dijagnostiku kombinacijom PCR amplifikacije i detekcije fluorescencije amplikona. Sistem je automatizovan, zatvoren, bez "post PCR" manipulacije za detekciju PCR produkata u reakcionoj posudi, čime je smanjen rizik od unakrsne kontaminacije. Omogućava jednostavnu, pouzdanu i preciznu kvantifikaciju.

U dijagnostici malarije, qPCR se primenjuje i kao skrining test za detekciju roda *Plasmodium*, i kao specijes-specifični qPCR za detekciju vrsta roda *Plasmodium* (89, 90, 91, 92). Nesporna prednost PCR tehnika u dijagnostici malarije je mogućnost detekcije niske parazitemije. Cnops i sar. (2011) našli su da je qPCR 8,3% uspešniji u dijagnostici importovane malarije u odnosu na mikroskopski pregled (93).

Visoka osetljivost PCR-a pomaže i kod pacijenata koji su započeli terapiju pre dijagnostike, te su paraziti morfološki izmenjeni ili vrlo retki (93), kao i u otkrivanju *P. falciparum* pri sekvestraciji, kada se mali broj parazita oslobađa u cirkulaciju (68). Molekularnim metodama je posebno unapređena dijagnostika mešanih infekcija što je vrlo bitno jer izostanak detekcije manje zastupljene vrste može značajno uticati na tok bolesti naročito ako je to *P. falciparum* (93, 94). Primenom PCR-a se prevazilazi problem morfološke sličnosti *P. vivax* i *P. ovale* koja dovodi do česte zamene ovih vrsta mikroskopskim pregledom (93). Konačno, molekularna dijagnostika je praktično jedini način da se potencijalno fatalna *P. knowlesi* malarija diferencira od ostalih vrsta (15, 43). Sem kliničke primene, PCR metode su našle mesto i u epidemiologiji, u istraživanjima vakcina i novih antimalarika. U kliničkoj dijagnostici i referentnim laboratorijama qPCR je metoda izbora, naročito u razvijenim zemljama gde se optimizuju brojni protokoli (92, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101). Za svega nekoliko godina od uvođenja PCR tehnologije u detekciju malarije izvršena su brojna istraživanja kojima



se različitim qPCR protokolima pokušava unaprediti specifičnost i osetljivost u detekciji i određivanju vrste plazmodijuma (83). Jednu od najosetljivijih i najspecifičnijih qPCR procedura za detekciju vrsta uz upotrebu konzerviranih prajmera i specijes-specifičnih proba, koja je široko zaživela i postala standard u molekularnoj dijagnostici malarije, opisali su Rougemont i sar. (2004) (100). Postignuta je kvalitetna detekcija sve četiri vrste ali je uočena niža osetljivost za mešane infekcije. Shokoples i sar. (2009) su modifikovali ovaj protokol u cilju prevazilaženja kompeticije sa DNK manje zastupljene vrste u mešanoj infekciji (101) uključivanjem specijes-specifičnog *forward* prajmera u kombinaciji sa konzerviranim *reverse* prajmerom i specijes-specifičnim probama u jednoj reakciji. Divis i sar. (2010) su postavku Rougemont i sar. (2004) nadogradili uvođenjem proba specifičnih za *P. knowlesi* radi identifikacije pete vrste malarije ljudi, sa osetljivošću od 3 par/ $\mu$ L krvi (97).

Ograničenja PCR metoda predstavljaju rizik od kontaminacije, naročito u laboratorijama u kojima se ova dijagnostika vrši svakodnevno (102), kao i zahtev za skupom opremom i reagensima i posebnim laboratorijskim uslovima, koji uglavnom nedostaju u endemskim područjima (103). Molekularna dijagnostika se međutim intenzivno uvodi u neendemska područja za dijagnostiku importovane malarije, posebno u laboratorije gde se malarija retko dijagnostikuje te parazitolozi ređe imaju prilike za sticanje iskustva.

Poslednjih godina u trendu su istraživanja primene novih molekularnih i drugih tehnologija za dijagnostiku malarije, naročito onih koje bi bile upotrebljive direktno na terenu. Aktuelna je procena upotrebljivosti metoda za detekciju nukleinskih kiselina poput *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) i *quantitative nucleic acid sequence-based amplification* (QT - NASBA), koje su već pokazale izvesnu kliničku primenu, dok su u fazi ispitivanja metoda na bazi masene spektrometrije (*laser-desorption mass spectrometry*, LDMS), metoda protočne citometrije za detekciju pigmenta plazmodijuma u Le, npr *cell-dyn full blood count* (FBC) *analyzers* za detekciju monocita sa pigmentom parazita ili *multiplex microsphere-based immunoassays* za detekciju specifičnih antitela, kao i tzv. *rolling circle-enhanced enzyme activity detection* (REED) metoda za merenje aktivnosti enzima tipozomeraze (58, 104, 105, 106, 107).



Nedostaci konvencionalne dijagnostike, ilustrirani slučajevima SMM, zahtevaju uvođenje molekularne dijagnostike u rutinsku praksu da bi se povećala dijagnostička osetljivost kod pacijenata sa niskom parazitemijom, tačno odredila vrsta i u skladu s tim primenila terapija, kao i da bi se u asimptomatskoj kategoriji putnika prepoznali nosioci retkih *Plasmodium* spp. u cilju prevencije ponovnog uspostavljanja transmisije. Danas je *state-of-the-art* metoda u ovom smislu qPCR, i to i za postavljanje dijagnoze i za potvrdu dijagnoze do nivoa vrste, ali još uvek nedostaju validne kliničke studije o upotrebljivosti i korisnosti u praćenju efekta terapije (93).

***CILJ RADA***

## 2. CILJ RADA

Unapređenje dijagnostike malarije obuhvata s jedne strane usavršavanje konvencionalne dijagnostike, pre svega mikroskopije kao zlatnog standarda, kao i brzih antigenskih testova, a s druge, na osnovu najnovijih naučnih dostignuća, uvođenje molekularnih metoda u kliničku dijagnostiku.

Osnovni cilj ovog istraživanja jeste evaluacija kliničkog značaja molekularne dijagnostike malarije.

Da bi se ovaj cilj realizovao, postavljeni su sledeći zadaci:

- Uvođenje i optimizacija protokola za molekularnu dijagnostiku malarije, i to kvantitativnog real-time PCR-a kao skrining testa za detekciju roda *Plasmodium*, i specijes-specifičnog kvantitativnog real-time PCR-a za detekciju vrsta roda *Plasmodium*;
- Evaluacija rezultata dobijenih primenom qPCR-a u odnosu na rezultate dobijene konvencionalnim metodama;
- Ispitivanje korelacije kinetike parazitske DNK tokom terapije sa kliničkim tokom i ishodom bolesti; i
- Redefinisanje dijagnostičkog algoritma za importovanu malariju u Srbiji u skladu sa dobijenim rezultatima.

## ***MATERIJAL I METODE***

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. DIZAJN ISTRAŽIVANJA

Da bi se u skladu sa ciljem ovog istraživanja izvršila evaluacija kliničkog značaja molekularne dijagnostike malarije, sprovedena je kohortna studija koja je obuhvatila sve putnike koji su se u definisanom periodu nakon povratka iz područja endemskih za malariju javili na Kliniku za infektivne i tropske bolesti (u daljem tekstu: Klinika) radi isključivanja ove infekcije, a kod kojih je dijagnoza malarije potvrđena ili isključena uporednom primenom referentnih metoda konvencionalne dijagnostike malarije i novo uvedenih metoda molekularne dijagnostike. Konvencionalna dijagnostika je vršena u vreme javljanja ispitanika na pregled a molekularna naknadno, posle uvođenja ove metodologije.

Istraživanje je obuhvatilo sve putnike povratnike iz malaričnih područja koji su se javili na Kliniku, uključujući bolesnike klinički suspektne na malariju, bolesnike sa podatkom o nedavno lečenoj malariji nezavisno od toga da li su u vreme dolaska na pregled imali tegobe, i zdrave putnike koji su upućeni na Kliniku radi preventivnog ispitivanja na malariju.

Konvencionalna dijagnostika je obuhvatila mikroskopiju a kod dela ispitanika i brzi test.

Molekularna dijagnostika importovane malarije vršena je primenom kvantitativnog real-time PCR-a, i to qPCR-a na nivou roda kao skrining testa a zatim qPCR-a na nivou vrste za detekciju vrste roda *Plasmodium* (specijes-specifični qPCR).

Skrining qPCR-om analizirani su inicijalni uzorci venske krvi svih ispitanika, a radi praćenja kinetike DNK i uzastopni uzorci onih koji su bili pozitivni na mikroskopiji i/ili skrining qPCR-u.

Specijes-specifični qPCR rađen je za identifikaciju četiri vrste roda *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* i *P. malariae*. Prvobitni plan rada je obuhvatio i uvođenje specifičnih proba za petu vrstu (*P. knowlesi*) za bolesnike sa dokazanom malarijom koja je importovana iz JI Azije, gde bi mogla postojati dilema u pogledu morfologije mikroskopski određene vrste roda *Plasmodium*, ali takvih slučajeva u analiziranom periodu nije bilo.

Prvo je izvršena validacija molekularnih testova. Za validaciju skrining qPCR-a kao pozitivna kontrola korišćen je ekstrakt DNK vrste *P. falciparum* iz kulture, dok su za validaciju specijes-specifičnog qPCR-a kao pozitivne kontrole korišćeni ekstrakti DNK sve četiri ispitivane vrste plazmodijuma prethodno dokazani kao pozitivni. Kao negativna qPCR kontrola služio je ekstrakt DNK prethodno dokazan kao negativan. Kao negativne kontrole za proveru specifičnosti skrining qPCR-a služili su bolesnici kod kojih je isključena malarija, a koji su imali infekcije koje mogu dati unakrsnu pozitivnost u ovom testu.

Pošto se radi o prvom uvođenju ove metodologije u našoj sredini, za obe metode sprovedena je i eksterna kontrola kvaliteta u relevantnim evropskim laboratorijama.

Parazitemija određena mikroskopijom i skrining qPCR-om je kvantifikovana i rezultati su međusobno upoređeni.

## **3.2. MATERIJAL**

### **3.2.1. MESTO I VREMENSKI PERIOD ISTRAŽIVANJA**

Konvencionalna dijagnostika malarije (mikroskopija i RDT) obavljena je na Odseku za parazitologiju Službe za mikrobiologiju KCS, a molekularna dijagnostika u Laboratoriji za medicinsku parazitologiju Instituta za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu.

Molekularna dijagnostika (skrining i specijes-specifični qPCR) rađena je od maja 2012. godine do maja 2013. godine, retrospektivno na uzorcima krvi prikupljenim od jula 2010. do maja 2012. godine, i prospektivno na uzorcima koji su sakupljeni od maja 2012. do maja 2013. godine.

### **3.2.2. ISPITANICI**

U studiju laboratorijske dijagnostike malarije uključeni su ispitanici koji su se javili radi pregleda i dijagnostike na Kliniku, koji su ispunjavali sledeće kriterijume:

- a) Epidemiološki podatak o boravku u malaričnom području uz febrilnost i/ili druge kliničke manifestacije (glavobolja, malaksalost, mijalgije, artralgie), i

- b) Epidemiološki nadzor nakon boravka u malaričnom području bez kliničkih tegoba.

Kontrolnu grupa bolesnika za procenu specifičnosti skrining qPCR-a sa agensima koji mogu dati unakrsnu reaktivnost sa 18S skrining probama (*Toxoplasma gondii*, *Leishmania* spp., *Pneumocystis jiroveci*), činila su četiri bolesnika koja nisu putovala u područja sa endemskom malarijom, i to dva sa akutnom toksoplazmozom (potvrđenom serološkim metodama i PCR-om), jedan bolesnik sa visceralnom lajšmaniozom (dokazanom nalazom amastigota *Leishmania* spp. u razmazima kostne srži bojenim po Gimzi) i jedan bolesnik sa AIDS-om kod koga je mikroskopski dokazan *P. jiroveci* kao uzrok intersticijalne pneumonije.

### 3.2.3. EPIDEMIOLOŠKI, KLINIČKI I HEMATOLOŠKI PODACI

Za sve ispitanike, i to za hospitalizovane bolesnike iz istorija bolesti a za ambulantne iz ambulantnih izveštaja, prikupljani su sledeći podaci: pol, životna dob, zemlja porekla ispitanika, zanimanje, mesto putovanja, razlog i dužina boravka u malaričnom području, korišćenje hemioprolifakse i prethodne epizode malarije. Klinička anamneza obuhvatala je podatke koji se odnose na vreme pojavljivanja tegoba nakon povratka iz malaričnog područja, vreme proteklo od pojave tegoba do javljanja na pregled, prethodnu terapiju antimalaricima, postojanje hroničnih bolesti, kao i kliničke manifestacije bolesti (febrilnost, jeza i drhtavica, glavobolja, malaksalost, mijalgije, splenomegalija, hepatomegalija i drugo). Analizirani su osnovni hematološki parametri [nivo Hgb, broj Er, Le i trombocita (Tr)] a od biohemijskih analiza vrednost LDH.

Za hospitalno lečene bolesnike uključeni su i podaci o vrsti i dužini primene antimalarične terapije.

Za bolesnike kod kojih je malarija isključena evidentirana je završna dijagnoza.

### 3.2.4. UZORKOVANJE KRV I ZA KONVENCIONALNU I MOLEKULARNU DIJAGNOSTIKU

Za konvencionalnu dijagnostiku korišćena je kapilarna venska krv uzimana iz jagodice prsta, dok je za molekularnu dijagnostiku korišćena periferna venska krv.

Uzorci kapilarne i periferne venske krvi su uzimani kod svih ispitanika na prijemu, a kod bolesnika sa dokazanom ili suspektom malarijom i u toku hospitalizacije u čestim intervalima prema kliničkim kriterijumima (prvih dana svaki dan, kasnije tokom primene terapije na 2 - 3 dana, a potom u vreme kliničkih kontrola na 7 dana).

Periferna venska krv uzimana je u sterilne *BD Vacutainer*<sup>®</sup> (*Becton, Dickinson and Company, New Jersey, SAD*) plastične epruvete sa antikoagulansom K<sub>2</sub> EDTA. Po 300 µL krvi stavljan je u dve obeležene epruvete (jedan uzorak namenjen za ekstrakciju a drugi rezervni). Do ekstrakcije DNK, uzorci krvi su čuvani zamrznuti na -70°C.

### **3.3. METODE**

#### **3.3.1. MIKROSKOPIJA**

Mikroskopija pojedinačnog uzorka je obuhvatala pregled po tri guste kapi i tri razmaza periferne krvi kod svih bolesnika suspektih na malariju na prijemu. Ako je malarija mikroskopski potvrđena, ispitivani su uzastopni uzorci u cilju praćenja parazitemije, tj. efekata primenjene terapije. Kod bolesnika kod kojih pri prvom mikroskopskom pregledu nisu uočeni plazmodijumi, mikroskopski pregled je ponavljan još najmanje dva puta pre isključivanja dijagnoze malarije.

##### **3.3.1.1. Uzorkovanje, bojenje i mikroskopija gustih kapi i razmaza periferne krvi**

###### *3.3.1.1.a. Priprema predmetnih stakala*

Pre upotrebe predmetnih stakala za pravljenje gustih kapi i krvnih razmaza vršeno je njihovo obezmaščivanje potapanjem u hrom sumpornu kiselinu tokom 24 h, a po ispiranju vodom i nakon sušenja, stakalca su kratko potapana u 70% alkohol, nakon čega su pojedinačno posušena i glancana čistom pamučnom krpom.



### *3.3.1.1.b. Pravljenje gustih kapi i razmaza periferne krvi*

Uzorkovanje su u radno vreme parazitološke laboratorije vršili iskusni laboratorijski tehničari. Izuzetak, kada se nije moglo uticati na kvalitet načinjenih preparata, činile su situacije kada su uzorci poslani iz drugih ustanova ili je uzorkovanje vršeno van radnog vremena parazitološke laboratorije kod klinički hitnih bolesnika. Tada su uzorkovanje, do dolaska parazitologa, obavljali hematološki laboranti u dežurnoj hematološkoj laboratoriji. Pri uzorkovanju su obavezno nošene zaštitne rukavice za jednokratnu upotrebu i maska za lice.

Jagodica domalog ili srednjeg prsta je dezinfikovana tupferom vate natopljenim 70% alkoholom. Prva kap, nakon uboda lancetom, odstranjivana je suvim delom tupfera vate, da bi se odstranio preostali alkohol. Pravljen je pet gustih kapi i pet razmaza periferne krvi. Guste kapi su pravljene nanošenjem dve do tri kapi krvi na sredinu pločice. Uglom druge pločice krv je širena u homogenu, ovalnu mrlju (oko 1 x 2 cm) odgovarajuće gustine da ne bi "spala" u postupku bojenja i ispiranja. Krvni razmazi su pravljene nanošenjem male kapi krvi na terminalni deo pločice. Zatim bi drugom pločicom, pod uglom od 45°, kap krvi bila razvučena naglim pokretom. Težilo se da krvni razmazi budu što tanji, tj. da u što većem delu razmaza Er budu poređani jedan do drugog, a ne preklopljeni. Guste kapi i krvni razmazi su potom sušeni na sobnoj temperaturi najmanje 30 minuta, optimalno 1 h, a vodilo se računa da budu zaštićeni od komaraca. Po tri guste kapi i tri krvna razmaza su bojena dok su po dva uzorka služila kao rezervni uzorci u slučaju neuspelog bojenja ili kod dijagnostičkih dilema.

### *3.3.1.1.c. Bojenje gustih kapi i krvnih razmaza po Gimzi*

Preparate su standardno bojili parazitološki laboranti, a van radnog vremena laboratorije specijalisti parazitologije.

Guste kapi nisu fiksirane u cilju hemolize Er. Krvni razmazi su fiksirani metil alkoholom, a nakon toga, razmazi i guste kapi bojena su 10% radnim rastvorom Gimze. Radni rastvor Gimze pravljen je sa puferizovanom destilovanom vodom pH 7,2 i Gimza bojom (*Merck*, Darmstadt, Nemačka). Svaka pločica prelivana je sa 5 mL radnog rastvora Gimze. Posle 30 minuta lagano je odlivana boja i preparati pažljivo ispirani pod

slabim mlazom tekuće vode. Potom su u vertikalnom položaju sušeni na sobnoj temperaturi.

#### *3.3.1.1.d. Mikroskopija gustih kapi i krvnih razmaza*

Mikroskopiju obojenih preparata obavljali su specijalisti parazitologije na *Zeiss Jena* ili *Leica* mikroskopu, na uveličanju  $\times 1000$  (u imerzionom sistemu mikroskopiranja). Prvo je obavljan pregled gustih kapi da se uoči eventualno prisustvo plazmodijuma, a potom su obavezno, nezavisno od rezultata mikroskopije gustih kapi, pregledani razmazi periferne krvi. Uzorci su proglašavani negativnim nakon najmanje 30 minuta mikroskopiranja, odnosno pregledom  $\geq 500$  vidnih polja. Ukoliko je bilo dijagnostičkih dilema (artefakti koji liče na plazmodijume, započeta terapija antimalaricima koja je usloвила redukciju broja i/ili izmenjenu morfologiju plazmodijuma) bojani su i rezervni preparati, čime je vreme mikroskopiranja bivalo znatno produženo.

Vrsta plazmodijuma određivana je pregledom razmaza periferne krvi na osnovu morfologije različitih stadijuma parazita i morfologije parazitiranih Er (Tabela 1) (108, 109).

Sem vrste, evidentirani su i uočeni stadijumi parazita, prisustvo poluraspadnutih parazita kao i prisustvo parazitskog pigmenta u Le. Vršena je i semikvantifikacija gametocita skorovanjem i to tako da je nalaz 1 - 10 gametocita u 100 vidnih polja skorovan kao retki gametociti (+), nalaz 11 - 100 parazita u 100 vidnih polja kao umereno prisutni (++) a ukoliko je u jednom vidnom polju uočeno  $> 1$  gametocita nalaz je skorovan kao brojni gametociti (+++).

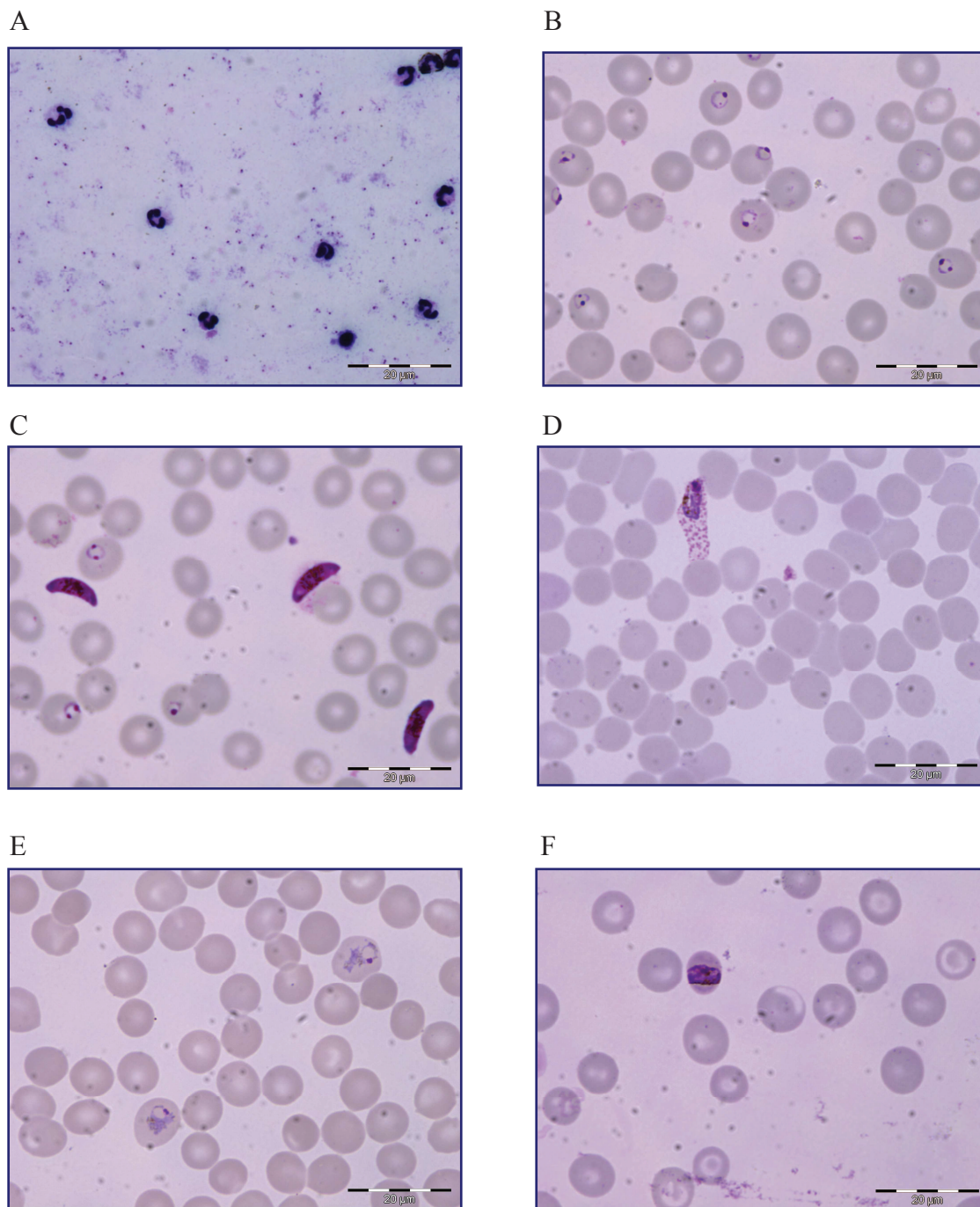
**Tabela 1.** Morfološke karakteristike vrsta *Plasmodium* spp. u razmazu periferne krvi i gustoj kapi

	<i>P. vivax</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. falciparum</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. knowlesi</i>
<b>karakteristika Er</b>	<b>morfologija pojedinih vrsta roda <i>Plasmodium</i> u razmazu periferne krvi</b>				
veličina	uvećan	nije uvećan	nije uvećan	uvećan	nije uvećan
obojenost	bled	normalna	normalna	bled	
oblik	okrugao	okrugao	okrugao	ovalan, narezuckan	okrugao, ponekad narezuckan obod
citoplazmatske inkluzije	<i>Schüffner</i> -ove granule	<i>Ziemann</i> -ove tačke*	<i>Maurer</i> -ove mrlje**	<i>Schüffner</i> -ove ili tzv. <i>James</i> -ove granule	<i>Sinton &amp; Mulligan</i> -ove mrlje***
<b>mladi trofozoiti (ring)</b>	<b>slični <i>P. falciparum</i></b>				
veličina	1/3 Er	do 1/3 Er	1/3 Er	1/3 Er	
oblik	gracilan	zbijen	vrlo gracilan	gust	
hromatin	pravilna tačka	krupna tačka, često unutar Er	pravilna tačka, često podeljen na 2 dela	gusta, jasno ograničena tačka	često podeljen na 2 dela
prilepljeni oblici	retko		često		retko
pigment		retko			
više parazita u Er	ponekad	retko	često sa visokom parazitemijom	retko	često sa visokom parazitemijom
<b>zreli trofozoiti</b>					
veličina	krupni	sitni	sitni	sitni	do 2/3 Er
oblik	ameboid	kompaktan, često forma "ešarpe"	kompaktan sa vakuolom	kompaktan	kompaktan, često forma "ešarpe", retko ameboid
hromatin	tačka ili navoj	prominira, najčešće na "ešarpi"	tačka ili navoj	velika nepravilna grumen	upadljiv, nepodeljen
pigment					retko; fino rasejan, tamno braon
<i>tekstura</i>	fina	gruba	gruba	gruba	
<i>boja</i>	žuto-braon	tamno braon	crn	tamno žuto-braon	
<i>količina</i>	umerena	obilan	umerena	umerena	
<i>distribucija</i>	raspršene fine čestice	raspršeni grumenovi	1 - 2 grumena	raspršene grube čestice	
<b>nezreli šizonti</b>					
veličina	zahvata skoro ceo Er	zahvata skoro ceo Er	zahvata skoro ceo Er	zahvata skoro ceo Er	zauzima 2/3 Er
oblik	sličan ameboidu	kompaktan	kompaktan	kompaktan	
hromatin	brojne, nepravilne mase	nekoliko nepravilnih masa	nepravilna masa	nekoliko nepravilnih masa	grozdast, podeljen na 2 - 5 delova
pigment	raštrkan	raštrkan	jedan grumen	raštrkan	obilan, braon-crni u vidu sitnih granula ili pramenova
<b>zreli šizonti</b>					
veličina	popunjen Er	gotovo ispunjen Er	gotovo ispunjen Er	popunjene 3/4 Er	zauzima skoro ceo Er
oblik	segmentiran	u vidu rozete	segmentiran	segmentiran	segmentiran
merozoiti					
<i>br merozoita raspon</i>	14 - 24	6 - 12	8 - 32	8 - 12	do 16
<i>srednji br merozoita</i>	16	8	24	8	16
<i>veličina</i>	umerena	krupni	sitni	krupni	
pigment	u centru, žuto-braon	u centru, tamno braon	u centru, crn	u centru, tamno žuto-braon	obilan, braon-crni u vidu sitnih granula ili pramenova

	<i>P. vivax</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. falciparum</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. knowlesi</i>
<b>karakteristika Er</b>					
<b>mikrogametociti (muški)</b>					
vrema pojavljivanja (u danima)	3 - 5	7 - 14	7 - 12	12 - 14	
brojnost u krvotoku	brojni	retki	brojni	retki	
veličina	zauzima 3/4 Er	1/2 do 2/3 Er	veći od Er	1/2 do 2/3 Er	nezreo: 2/3 Er, zreo: ceo Er
oblik	okrugao ili ovalan, kompaktan	okrugao, kompaktan	bubrežast, zaobljenih krajeva	okrugao, kompaktan	okrugao
citoplazma	bledo plava	bledo plava	crvenkasto-plava	bledo plava	crvenkasto-ljubičasta
hromatin	pojedinačan	pojedinačan	fine, raspršene granule	pojedinačan	tamnija veća masa, različito smeštena
pigment	guste braon granule	guste braon granule	guste tamne granule	guste braon granule	raštrkan
<b>makrogametociti (ženski)</b>					
vrema pojavljivanja (u danima)	3 - 5	7 - 14	7 - 12	12 - 14	
brojnost u krvotoku	brojni	retki	brojni	retki	
veličina	zauzima 3/4 Er	1/2 do 2/3 Er	veći od Er	1/2 do 2/3 Er	nezreo 2/3 Er, zreo: ceo Er
oblik	tačka ili navoj	okrugao, kompaktan	polumesečast, zašiljenih ili zaobljenih krajeva	okrugao, kompaktan	okrugao
citoplazma	tamno plava	tamno plava	tamno plava	tamno plava	plavkasta
hromatin	kompaktna periferna masa	kompaktna periferna masa	u centru	kompaktna periferna masa	kompaktna periferna masa
pigment	oskudan, duž periferije	oskudan, duž periferije	crne štapičaste granule oko nukleusa	oskudan, duž periferije	tamno braon, nepravilno razbacan
<b>morfologija pojedinih vrsta roda <i>Plasmodium</i> u gustoj kapi</b>					
mlad trofozoit (ring)	sitni, gracilni, često isprekidani	kompaktan prsten	veoma sitni, neisprekidani, gracilni sa vakuolom	kompaktan prsten	slični <i>P. falciparum</i>
zreli trofozoiti	markantna, nepravilna citoplazma	čvrsta pravilna citoplazma	sitni, sa vakuolom	čvrsta pravilna citoplazma	slični <i>P. falciparum</i>
šizonti	brojni, prosečno 16 sitnih merozoita	retki, prosečno 8 krupnih merozoita	retko su prisutni (sitni, brojni merozoiti)	retki, prosečno 8 krupnih merozoita	slični <i>P. malariae</i>
gametociti	kompaktni, odgovaraju opisu iz razmaza	teško se razlikuju od <i>P. vivax</i>	polumesečasti	teško se razlikuju od <i>P. vivax</i>	slični <i>P. malariae</i>

Skraćenice u tabeli: Er - eritrocit; \*ne uočavaju se klasičnim bojenjem krvnih razmaza; \*\*retko se uočavaju kod zrelih trofozoita; \*\*\*kod zrelih trofozoita i šizonta

Na slici 3 prikazani su pojedini stadijumi razvoja *Plasmodium* spp. na mikroskopskim preparatima tj. gustim kapima i razmazima periferne krvi bojenim po Gimzi.



**Slika 3.** Mikrofotografije gustih kapi i krvnih razmaza bojenih po Gimzi različitih stadijuma plazmodijuma (uveličanje x 1000): (A) gusta kap, trofozoiti *P. falciparum*; (B) krvni razmaz, trofozoiti *P. falciparum*; (C) krvni razmaz, trofozoiti i gametociti *P. falciparum*; (D) krvni razmaz, trofozoit *P. ovale*; (E) krvni razmaz, trofozoiti *P. vivax*; (F) krvni razmaz, trofozoit *P. malariae* (fotografije načinjene na Institutu za medicinska istraživanja UB ljubaznošću dr Mirele Budeč)

### *3.3.1.1.e. Određivanje parazitemije plazmodijuma*

Parazitemija je izražavana kao procenat (%) Er parazitiranih aseksualnim stadijumima *Plasmodium*-a, što je rutinski metod za neendemska područja (68). U 10 vidnih polja razmaza periferne krvi pod imerzijom brojani su parazitirani Er (nezavisno od broja parazita u jednom Er) i ukupan broj Er. Parazitemija je izračunavana prema formuli:  $\% (P) = N/M \times 100$  (P - parazitemija, N - srednja vrednost broja parazitiranih Er i M - srednji broj Er u vidnom polju).

Parazitemija izražena u % je radi poređenja sa rezultatima molekularne dijagnostike konvertovana u broj par/ $\mu$ L krvi. Konvertovanje procentualno izražene parazitemije u broj par/ $\mu$ L krvi vršeno je na osnovu pretpostavke da 1  $\mu$ L krvi sadrži  $5 \times 10^6$  Er (113). Parazitemija od 1% odgovara parazitemiji od 1 par/100 Er, odnosno 50.000 par/ $\mu$ L, a 0,1% odgovara parazitemiji od 5.000 par/ $\mu$ L krvi.

### **3.3.2. BRZI ANTIGENSKI TEST ZA DETEKCIJU HRP2 ANTIGENA *P. falciparum***

Brzi antigeni test (*Visitect® Malaria Pf - Omega Diagnostics Ltd*, London, Velika Britanija) za detekciju HRP2 antigena *P. falciparum* primenjivan je samo za inicijalnu dijagnostiku. Test pripada grupi imunohromatografskih testova. Test je izvođen i očitavan prema uputstvu proizvođača. Ukoliko je u uzorku prisutan HRP2 antigen, dolazi do stvaranja kompleksa sa monoklonskim antitelima što se manifestuje pojavom ružičasto obojene linije, a rezultat se smatra pozitivnim nezavisno od intenziteta boje.

### **3.3.3. MOLEKULARNE METODE**

#### **3.3.3.1. Ekstrakcija DNK**

Ekstrakcija DNK iz krvi vršena je komercijalnim kitom (*GeneJET™ Genomic DNA purification kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD*) prema uputstvu proizvođača, uz manje modifikacije. Odmrznut uzorak krvi je homogenizovan i za dalji

rad korišćeno je 200  $\mu$ L. U to je dodavano po 400  $\mu$ L pufera za liziranje i 20  $\mu$ L proteinaze K. Liziranje se odvijalo u termomikseru (*Eppendorf Thermomixer 1,5 mL Comfort*, Nemačka) pri rotaciji od 500 obrtaja u minuti, na 56°C, 10 minuta ili po potrebi i duže, do potpune lize. U lizirani uzorak je dodavano po 200  $\mu$ L 96% etanola, i sadržaj je prebacivan u kolonice (*GeneJET™ Genomic DNA Purification columns*), u kojima se, centrifugiranjem na 7000 obrtaja u toku 1 minuta (*Eppendorf Centrifuge 5415R*, Nemačka), DNK vezivala za membranu. Posle ispiranja radi uklanjanja ćelijskog detritusa uzorci su resuspendovani u vodi bez nukleaza, tako da je finalni produkt bila DNK resuspendovana u 120  $\mu$ L. Ekstrahovana DNK je čuvana na - 70°C do izvođenja qPCR-a.

### 3.3.3.2. Kvantitativni real-time PCR za detekciju roda *Plasmodium* (skrining qPCR)

Detekcija DNK roda *Plasmodium* rađena je pomoću qPCR-a u kome je kao ciljani gen korišćen visoko konzervirani region 18S rRNK gena, prema protokolu Rougemont i sar. (2004) (100). Ovom metodom se pomoću prajmera *Plasmo1* i *Plasmo2* i probe *Plasprobe* (Tabela 2) detektuju sve četiri glavne vrste roda *Plasmodium* jer se amplifikuje segment od 157 - 165 bp koji je prisutan kod svih. Amplifikacija je vršena na aparatu *Mastercycler® ep realplex4* (*Eppendorf AG*, Hamburg, Nemačka) sa pratećim softverom.

**Tabela 2.** Sekvence prajmera i proba i program za skrining qPCR

	<i>naziv</i>	<i>sekvence</i>
<b>prajmeri</b>	<i>Plasmo1</i>	5'-GTTAAGGGAGTGAAGACGATCAGA-3'
	<i>Plasmo2</i>	5'-AACCCAAAGACTTTGATTTCTCATAA-3'
<b>proba</b>	<i>Plasprobe</i>	5'-FAM- ACCGTCGTAATCTTAACCATAAACTATGCCGACTAG- TAMRA-3'
<b>qPCR program</b>	2 min 50°C 10 min 95°C 45 x 15 sek 95°C 1 min 60°C	



**Tabela 3.** Reakciona smeša za skrining qPCR za detekciju DNK roda *Plasmodium* po uzorku

<i>osnovni mix</i>	<i>volumen u <math>\mu\text{L}</math></i>	<i>finalna koncentracija</i>
<i>TaqMan</i> master mix	10,0	
<i>forward</i> prajmer ( <i>Plasmo1</i> )	0,5	200 nM
<i>reverse</i> prajmer ( <i>Plasmo2</i> )	0,5	200 nM
proba ( <i>Plasprobe</i> )	0,5	50 nM
UNG	0,5	
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,0	
H <sub>2</sub> O	4,0	
<b>ukupna zapremina</b>	<b>17</b>	

Analiza svih uzoraka je rađena u duplikatu. Reakciona smeša pripremana je za ukupan broj uzoraka u reakciji za skrining qPCR, dok je zapremina reakcione smeše po uzorku iznosila 17  $\mu\text{L}$  i sadržala je: 10  $\mu\text{L}$  Maxima® Probe/Rox qPCR Master Mix (*Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, SAD*), 0,5  $\mu\text{L}$  *Uracil-DNA Glycosylase* (UNG), 0,5  $\mu\text{L}$  200 nM *forward* prajmer (*Plasmo1*), 0,5  $\mu\text{L}$  200 nM *reverse* prajmer (*Plasmo2*), 0,5  $\mu\text{L}$  50 nM probe (*Plasprobe*), 1  $\mu\text{L}$  MgCl<sub>2</sub> i 4  $\mu\text{L}$  vode bez nukleaza (Tabela 3). Kao negativne kontrole korišćeni su voda bez nukleaza i DNK izolovana od zdravih osoba koje nisu boravile u malaričnom području. Za pozitivnu kontrolu korišćena je DNK ekstrahovana iz kulture *Dd2 Plasmodium* linije *P. falciparum*, koja je dobijena ljubaznošću prof. Sanjeev Krishna sa *St. George* Univerziteta u Londonu. Nakon dodavanja 3  $\mu\text{L}$  DNK, odnosno vode za negativnu kontrolu, finalni volumen po uzorku bio je 20  $\mu\text{L}$ .

Program za amplifikaciju DNK plazmodijuma se sastojao od sledećih koraka: aktivacija i delovanje enzima UNG u trajanju od 2 minuta na 50°C, inicijalna denaturacija 10 minuta na 95°C i potom vezivanje prajmera i elongacija 1 minut na 60°C (Tabela 2). Rezultati su smatrani pozitivnim ukoliko je fluorescentni signal rastao iznad praga pozitivnosti (*cycle threshold* - C<sub>T</sub>) unutar 40 ciklusa, i obrnuto, ukoliko signal nije detektovan u toku 40 ciklusa, uzorak je smatran negativnim.



### 3.3.3.3. Kvantitativni real-time PCR za detekciju vrsta roda *Plasmodium* (specijes-specifični qPCR)

Specijes-specifičnim qPCR-om uzorci su ispitani na sve četiri vrste roda *Plasmodium*. Za identifikaciju *P. falciparum*, *P. vivax* i *P. ovale*, izvođen je protokol prema Perandin-a i sar. (2004), a za *P. malariae* protokol prema Rougemont-a i sar. (2004) (92, 100). Korišćeni su komercijalni prajmeri i probe za 18S rRNK gen, specifični za svaku vrstu (Tabela 4). Za *P. falciparum*, *P. vivax* i *P. ovale* korišćeni su prajmeri i probe proizvođača *Metabion International AG*, Nemačka, a za *P. malariae* proizvođača *Invitrogen*, SAD.

**Tabela 4.** Sekvence prajmera i proba i program za specijes-specifični qPCR

<i>Plasmodium</i> spp.	prajmeri i probe	sekvence (5'-3')
<i>P. falciparum</i>	<i>FAL-F</i>	5'-CTT TTG AGA GGT TTT GTT ACT TTG AGT AA-3'
	<i>FAL-R</i>	5'-TAT TCC ATG CTG TAG TAT TCA AAC ACA A-3'
	<i>FAL probe</i>	5'-FAM-TGT TCA TAA CAG ACG GGT AGT CAT GAT TGA GTT CA-TAMRA-3'
<i>P. vivax</i>	<i>VIV-F</i>	5'-ACG CTT CTA GCT TAA TCC ACA TAA CT-3'
	<i>VIV-R</i>	5'-ATT TAC TCA AAG TAA CAA GGA CTT CCA AGC-3'
	<i>VIV probe</i>	5'-TET-TTC GTA TCG ACT TTG TGC GCA TTT TGC-TAMRA-3'
<i>P. ovale</i>	<i>OVA-F</i>	5'-TTT TGA AGA ATA CAT TAG GAT ACA ATT AAT G-3'
	<i>OVA-R</i>	5'-CAT CGT TCC TCT AAG AAG CTT TAC AAT-3'
	<i>OVA probe</i>	5'-Yakima Yellow™-CCT TTT CCC TAT TCT ACT TAA TTC GCA ATT CAT G-TAMRA-3'
<i>P. malariae</i>	<i>Mal-F</i>	5'-CCG ACT AGG TGT TGG ATG ATA GAG TAA A-3'
	<i>Plasmo2*</i>	5'-AACCCAAAGACTTTGATTTCTCATAA-3'
	<i>Malaprobe</i>	5'-FAM-CTA TCT AAA AGA AAC ACT CAT-MGBNFQ
<b>qPCR program</b>	2 min 50°C 10 min 95°C 45 x 15 sek 95°C 1 min 60°C	

\*Reverzni prajmer (*Plasmo2*) upotrebljen za skrining qPCR korišćen je i u protokolu identifikacije *P. malariae*; MGBNFQ - *minor groove binding nonfluorescent quencher*

Tabela 5. Reakciona smeša za specijes-specifični qPCR po uzorku

<i>osnovni mix</i>	<i>volumen u <math>\mu</math>L</i>	<i>konc za Pf, Pv i Po (nM)</i>	<i>finalna konc za Pm (nM)</i>
<i>TaqMan master mix</i>	12,5		
<i>prajmer forward</i>	0,3	300	100
<i>prajmer reverse</i>	0,3	300	200
<i>proba</i>	0,3	200	100
<b>MgCl<sub>2</sub> (50 mM)</b>	1,0		
<b>H<sub>2</sub>O</b>	7,6		
<b>ukupna zapremina</b>	<b>22</b>		

Prilikom određivanja vrste *Plasmodium* spp., svi uzorci su rađeni u duplikatu. Reakcija je izvođena u ukupnoj zapremini od 25  $\mu$ L, od čega je 3  $\mu$ L DNK činilo templat, dok je ostatak činila reakciona smeša [12,5  $\mu$ L Maxima® Probe/Rox qPC12 Master Mix (*Fermentas*), 0,3  $\mu$ L 300 nM specijes-specifični *forward* prajmer, 0,3  $\mu$ L 300 nM specijes-specifični *reverse* prajmer, 0,3  $\mu$ L 200 nM specijes-specifične probe, 1  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> i 7,6  $\mu$ L vode bez nukleaza]. Kao negativne kontrole korišćeni su voda bez nukleaza i DNK izolovana od zdravih osoba koje nisu boravile u malaričnom području. Kao pozitivne kontrole korišćeni su uzorci DNK ekstrahovane iz krvi bolesnika sa definisanom parazitemijom; za *P. falciparum* i *P. malariae* koristili smo uzorke DNK od naših bolesnika sa parazitemijom od 2% odn. 0,015%, a za *P. ovale* i *P. vivax* uzorke DNK od bolesnika sa parazitemijom od 0,001% odn. 0,05% na raspolaganje nam je ljubazno stavila prof. Ana Färnert (Univerzitetaska bolnica Karolinska, Stokholm, Švedska).

Specijes-specifični qPCR rađen je na *Mastercycler® ep realplex4* (*Eppendorf AG*, Hamburg, Nemačka), i za sve vrste korišćen je isti protokol: 2 minuta na 50°C, 10 minuta na 95°C, 45 ciklusa od 15 sekundi na 95°C i 1 minut na 60°C (Tabela 4). Uzorak je smatran pozitivnim ukoliko je fluorescentni signal rastao iznad praga pozitivnosti ( $C_T$ ) u toku 40 ciklusa amplifikacije.

U svim fazama molekularne dijagnostike preduzimane su sve potrebne mere za prevenciju moguće kontaminacije, koje su uključivale rad sa sterilnim potrošnim materijalom, rad u laminarnim komorama sa HEPA filterima i UV svetlom, kao i poštovanje svih procedura radnih protokola.

#### 3.3.3.4. Analitička osetljivost i specifičnost kvantitativnog real-time PCR-a

Analitička osetljivost 18S skrining qPCR-a određena je ispitivanjem desetostrukih razblaženja DNK bolesnika kod koga je mikroskopski dijagnostikovana *P. falciparum* infekcija sa parazitacijom od 3,3%.

Za određivanje specifičnosti skrining qPCR-a korišćeni su uzorci zdravih osoba koje nisu boravile u malaričnim područjima (negativne kontrole) kao i uzorci bolesnika iz ranije opisane kontrolne grupe koju su činila četiri bolesnika koja nisu putovala u područja sa endemskom malarijom, i to dva sa akutnom toksoplazmozom, i po jedan bolesnik sa visceralnom lajšmaniozom i *P. jiroveci* pneumonijom.

Određivanje osetljivosti i praga detekcije za pojedinačne vrste roda *Plasmodium* vršeno je ispitivanjem serijskih razblaženja pozitivnih kontrola.

#### 3.3.3.5. Eksterna kontrola kvaliteta dobijenih rezultata

Na početku uvođenja skrining qPCR-a, u toku standardizacije protokola, 10 uzoraka odabranih metodom slučajnog izbora ispitano je, ljubaznošću prof. Isabelle Villena, u Parazitološkoj laboratoriji Univerzitetske bolnice u Remsu, Francuska, čime je proverena validnost primenjenog protokola.

Provera validnosti specijes-specifičnog qPCR-a izvršena je u Univerzitetskoj bolnici Karolinska, Stokholm, Švedska, ispitivanjem 11 spornih uzoraka konvencionalnim PCR-om.

#### 3.3.3.6. Kvantifikacija parazitacije

Za poređenje parazitacije određene mikroskopijom i qPCR-om, korišćeni su samo uzorci kod kojih je mikroskopski nalaz (broj parazita) izražen numerički.

Parazitacija je kvantifikovana putem standardne krive ( $y = ax + b$ ) dobijene na osnovu rezultata analize serije desetostrukih razblaženja DNK izolovane od bolesnika sa *P. falciparum* infekcijom i parazitacijom od 3,3%. Dobijena  $C_T$  vrednost za svaki uzorak je konvertovana u broj par/ $\mu$ L krvi pomoću *Excel* softvera. Parazitacija

kontrolnih uzoraka preračunavana je iz % takođe u broj par/ $\mu$ L, računajući, kao što je već opisano u 3.3.1.1.e., da 1% parazitemija označava 50.000 par/ $\mu$ L krvi.

### 3.3.3.7. Statistička analiza rezultata

U analizi podataka korišćeni su, osim osnovnih metoda deskriptivne statistike (aritmetička sredina, standardna devijacija, grupisanje), i metode parametrijske ( $t$ -test) i neparametrijske [hi-kvadrat test ( $X^2$ )] statistike. Poređenje kliničkih, demografskih i epidemioloških karakteristika, kao i rezultata laboratorijskih analiza (hemoglobinemija, eritrocitopenija, leukopenija, trombocitopenija, povišen LDH) između grupa bolesnika sa potvrđenom malarijom i onih kod kojih je malarija isključena vršeno je  $X^2$  testom, dok je poređenje vrednosti hematoloških i biohemijskih analiza (nivo Hgb, Er, Le, Tr, LDH), dužine trajanja parazitemije i DNK-nemije vršeno  $t$ -testom. Granicom statističke značajnosti smatrana je verovatnoća od 5% ( $P < 0,05$ ).

Dijagnostičke metode su međusobno poređene pomoću standardnih mera slaganja između testova, i to pomoću tablica kontingencije 2 x 2 na zbirnom nivou, a na osnovu korelacije rezultata (nivoi parazitemije) kod pojedinačnih bolesnika. Kao standardne mere slaganja testova izračunavani su osetljivost, specifičnost, pozitivna i negativna prediktivna vrednost, kao i realno statističko slaganje rezultata (*kappa* statistika). Osetljivost je izračunavana prema formuli  $[SP / (SP + LN)] \times 100$ , specifičnost =  $[SN / (SN + FP)] \times 100$ , pozitivna prediktivna vrednost (PPV) =  $[SP / (SP+LP)] \times 100$ , a negativna prediktivna vrednost (NPV) =  $[SN / (SN+LN)] \times 100$  (SP - stvarno pozitivno; LP - lažno pozitivno; SN - stvarno negativno; LN - lažno negativno). Nivoi slaganja za *kappa* ( $k$ ) analizirani su po protokolu Landis i Koch-a (1977). Moguće vrednosti  $k$  su u rasponu od -1 do 1. Negativne vrednosti ukazuju na to da postoji slaganje manje od slučajnog, što znači da postoji sistematsko neslaganje između testova. Pozitivne vrednosti definišu slaganje između testova koje je više nego slučajno. *Kappa* vrednost od 0,01 - 0,20 označava neznatno slaganje, 0,21 - 0,40 umereno, 0,41 - 0,60 dobro slaganje, 0,61 - 0,80 znatno i od 0,81 - 0,99 gotovo savršeno slaganje (110).

Korelacija između nivoa parazitemije dobijenih mikroskopijom, skrining qPCR-om, i specijes-specifičnim qPCR-om, ispitivana je pomoću Pirsonovog koeficijenta

korelacije. Negativni qPCR nalaz je za potrebe analize računat sa vrednošću  $C_T=45$  (maksimalan broj ciklusa u reakciji). Vrednosti Pirsonovog koeficijenta ispod 0,3 smatrane su za slabu korelaciju, od 0,3 - 0,7 za umerenu, 0,7 - 0,9 jaku i preko 0,9 za vrlo jaku korelaciju.

Statistička obrada je obavljena u *SPSS* programu verzija 11.5 (*SPSS Inc.*, Čikago, IL, SAD).

### **3.3.3.8. Odobrenje Etičkog komiteta**

Istraživanje je dobilo odobrenje Etičkog komiteta Instituta za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu (broj EO 101/2012) i Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (broj 29/X-12). Studija je obuhvatala prikupljanje uzoraka krvi što je eventualno moglo bolesnicima izazvati izvesnu neprijatnost. Takođe, uključivala je prikupljanje podataka iz istorije bolesti, ali je pristup podacima odobren samo istraživačkom timu. Ovi negativni aspekti smatrani su sekundarnim u odnosu na dobrobit koja nastaje unapređenjem dijagnostike malarije.

***REZULTATI***

## 4. REZULTATI

U istraživanje laboratorijske dijagnostike malarije uključeno je ukupno 109 ispitanika lečenih na Klinici, koji su ispunjavali sledeće kriterijume:

- A) febrilnost (n=83) i/ili druge kliničke manifestacije (n=14) nakon boravka u malaričnom području (n=97);
- B) epidemiološki nadzor nakon boravka u malaričnom području bez kliničkih tegoba (n=12).

Epidemiološki podatak o putovanju u malarično područje imalo je 108 ispitanika, a uključena je i jedna febrilna bolesnica sa nedovoljno ubedljivim epidemiološkim rizikom (letovanje u Grčkoj).

Epidemiološkim nadzorom obuhvaćeni su bolesnici koji su se na Kliniku javili nakon povratka iz malaričnog područja i bili dobrog opšteg stanja u trenutku pregleda, ali su bili nedavno lečeni od malarije (SPM - *status post malariam*) (n=10), ili su dali podatak o ubodu komaraca tokom boravka u malaričnom području (n=2).

### 4.1. DEMOGRAFSKE, EPIDEMIOLOŠKE, KLINIČKE I LABORATORIJSKE KARAKTERISTIKE ISPITANIKA

Demografske i epidemiološke karakteristike svih 109 ispitanika prikazane su u tabeli 6. Ispitanici su većinom bili muškog pola (n=93, 85,3%). Srednja životna dob iznosila je  $47,0 \pm 14,6$  (4 - 80) godina, a većinu ispitanika činili su državljani Srbije (n=100, 91,7%) i to radno sposobno stanovništvo. Posao je bio glavni razlog putovanja (n=91, 83,5%) i većinom se radilo o građevinskim radnicima na poslovima izgradnje puteva i stambenih objekata u afričkim zemljama (n=71, 65,1%). Najveći broj ispitanika boravio je u endemskim područjima za malariju duže od šest meseci (n=77, 70,7%). Međutim, antimalaričnu profilaksu koristilo je svega pet ispitanika, od toga samo dvoje redovno (1,8%). Afrika je bila najposećeniji kontinent (n=99, 90,8%), a zemlja u kojoj je najveći broj boravio Ekvatorijalna (E.) Gvineja (n=38, 34,9%) (Tabela 6). Ranije epizode malarije imalo je 72 ispitanika (66,1%), i to prosečno  $3,0 \pm 2,5$  (raspon 1 - 12) epizode.

**Tabela 6.** Demografske i epidemiološke karakteristike 109 ispitanika pregledanih na malariju

<i>karakteristike</i>	<i>br</i>	<i>%</i>
<b>muškarci</b>	93	85,3
<b>srednja životna dob ± SD u god (raspon): 47,0 ± 14,6 (4 - 80)</b>		
<b>starosna dobna grupa (u god)</b>		
< 10	1	0,9
10 - 19	0	0,0
20 - 29	14	12,8
30 - 39	22	20,2
40 - 49	16	14,7
50 - 59	38	34,9
> 60	18	16,5
<b>zemlja porekla ispitanika</b>		
Srbija	100	91,7
<i>region unutar Srbije</i>		
<i>Beograd</i>	69	63,3
<i>Centralna Srbija</i>	25	22,9
<i>Vojvodina</i>	6	5,5
druge zemlje*	9	8,3
<b>razlog putovanja u malarično područje</b>		
posao	91	83,5
turizam	8	7,3
ostalo	10	9,2
<b>zanimanje</b>		
osoblje avio kompanija	6	5,5
građevinska zanimanja	71	65,1
ostalo	32	29,4
<b>dužina boravka</b>		
< 3 ned	8	7,3
3 ned - 6 mes	22	20,2
> 6 mes	77	70,7
živi tamo	2	1,8
<b>antimalarična profilaksa</b>		
da, redovno	2	1,8
da, neredovno	3	2,7
alternativna profilaksa	3	2,7
ne	101	92,8
<b>prethodne epizode malarije</b>		
da	72	66,1



<i>karakteristike</i>	<i>br</i>	<i>%</i>
<b>MESTO PUTOVANJA</b>		
kontinent		
Afrika	99	90,8
Azija	8	7,4
Evropa	1	0,9
J. Amerika	1	0,9
region		
centralna Afrika	57	52,4
istočna Afrika	11	10,1
zapadna Afrika	30	27,5
istočna i zapadna Afrika	1	0,9
južna Azija	3	2,8
jugoistočna Azija	3	2,8
južna i jugoistočna Azija	2	1,8
Južna Amerika	1	0,9
Evropa	1	0,9
zemlja		
Angola	8	7,3
Avganistan	1	0,9
Brazil	1	0,9
Čad	3	2,8
E. Gvineja	38	34,9
Etiopija	3	2,8
Gabon	4	3,7
Gana	11	10,1
Grčka	1	0,9
Indija	2	1,8
Kenija	2	1,8
Kongo	3	2,8
Liberija	1	0,9
Madagaskar	1	0,9
Nigerija	15	13,8
Senegal	1	0,9
Sijera Leone	1	0,9
Tanzanija	1	0,9
Uganda	4	3,7
Zambija	1	0,9
više afričkih	2	1,8
više azijskih	5	4,6

\*Crna Gora, Republika Srpska (BiH), Engleska, Italija, Kina, SAD, Uganda

Od ukupnog broja ispitanika, 97 (89,0%) je imalo kliničke simptome. Kod 21 (21,6%) bolesnika tegobe su započele pre povratka u zemlju, dok su kod najvećeg broja (n=28, 28,9%) započele u toku prve nedelje po dolasku u zemlju (Tabela 7). Srednje vreme od pojave tegoba do javljanja na pregled, za 96 bolesnika kod kojih je evidentiran ovaj podatak, bilo je  $5,1 \pm 8,2$  (1 - 60) dana.

Osamnaest (18,6%) bolesnika je samoinicijativno, pre javljanja na pregled, bilo započelo terapiju antimalaricima, ili je terapija ordinirana u drugoj zdravstvenoj ustanovi, najčešće u zemlji inficiranja (Tabela 7).

**Tabela 7.** Kliničko-laboratorijske karakteristike 97 bolesnika sa tegobama pregledanih na malariju

<i>karakteristike</i>	<i>br</i>	<i>%</i>
<b>vreme od dolaska u zemlju do pojave tegoba</b>		
došao bolestan	21	21,6
1 - 7 dana	28	28,9
8 - 14 dana	15	15,5
15 dana - 1 mesec	13	13,4
1 - 2 mes	3	3,1
2 mes - 1 god	13	13,4
duže od 1 god	4	4,1
<b>prethodna terapija antimalaricima</b>	18	18,6
<b>hronične bolesti</b>	19	19,6
<b>KLINIČKA SLIKA</b>		
febrilnost	83	85,6
jeza/drhtavica	54	55,7
glavobolja	40	41,2
malaksalost	54	55,7
mijalgije	45	46,4
splenomegalija	26	26,8
hepatomegalija	33	34,0
splenohepatomegalija	21	21,6
<b>HEMATOLOŠKE ANALIZE</b> $\bar{x} \pm SD$ (raspon)		
Hgb (n=94)	137,8 $\pm$ 21,3 (79 - 189)	
hemoglobinemija	23	24,5
Er (n=94)	4,5 $\pm$ 0,65 (2,6 - 6,3 x 10 <sup>12</sup> )	
eritrocitopenija	48	51,1
Le (n=94)	7,3 $\pm$ 4,47 (2,4 - 21,4 x 10 <sup>9</sup> )	
leukopenija	22	23,4
Tr (n=93)	157,2 $\pm$ 94,5 (11 - 520 x 10 <sup>9</sup> )	
trombocitopenija	47	50,5
LDH (n=63)	673,7 $\pm$ 413,0 (289 - 2877)	
↑ LDH	44	69,8

Skraćenice u tabeli:  $\bar{x}$  - srednja vrednost; SD - standardna devijacija; Hgb - hemoglobin; Er - eritrociti; Le - leukociti; Tr - trombociti. Referentne vrednosti: Hgb: < 120 za žene, 130 g/L za muškarce; Er: < 4,2 za žene, 4,5 x 10<sup>12</sup>/L za muškarce; Le: < 4 x 10<sup>9</sup>/L; Tr: < 150 x 10<sup>9</sup>/L; LDH: > 460 U/L

U kliničkoj slici dominirala je febrilnost, i to kod 83 (85,6%) bolesnika. Među 26 afebrilnih ispitanika, osim 12 ispitanika koji su uključeni radi epidemiološkog nadzora, našlo se i 14 bolesnika sa drugim tegobama koje su obavezivale na isključenje malarije (glavobolja, malaksalost, mijalgije, artralgijske). Hepatomegalija je evidentirana kod 33 (34,0%) bolesnika, među kojima je 21 (21,6%) imao uvećanu jetru i slezinu. U

hematološkim nalazima kod 48 (51,1%) bolesnika zabeležen je pad Er, dok je kod 47 (50,5%) zabeležena trombocitopenija (Tabela 7).

#### **4.2. KLASIFIKACIJA ISPITANIKA NA OSNOVU MIKROSKOPSKE DIJAGNOSTIKE**

Kod svih 109 ispitanika je na prijemu urađen mikroskopski pregled gustih kapi i krvnih razmaza na prisustvo *Plasmodium* spp. Kod sumnje na infekciju *P. falciparum*-om na prijemu je rađen i brzi test za detekciju HRP2 antigena *P. falciparum*.

Nakon sprovedene konvencionalne dijagnostike, a uz uvažavanje kliničkih kriterijuma, ispitanici su svrstani u dve grupe:

1. Bolesnici lečeni od malarije (n=45), koji su prema mikroskopskom nalazu svrstani u dve podgrupe:

- a) Bolesnici kod kojih je malarija mikroskopski dokazana (n=42), i
- b) Bolesnici kod kojih malarija nije mikroskopski dokazana (nezavisno od nalaza brzog testa), koji su epidemiološki i klinički odgovarali malariji i imali adekvatan terapijski odgovor na antimalarike, čime je dijagnoza postavljena *ex iuvantibus* (n=3).

2. Grupa povratnika iz endemskih područja koji su bili suspekti na malariju ali su na osnovu višekratne negativne mikroskopije (nezavisno od rezultata brzog testa) proglašeni negativnim (n=64). U ovu grupu je uključeno i 12 putnika ispitanih u sklopu epidemiološkog nadzora. Kod svih ovih bolesnika postavljena je dijagnoza druge bolesti kao uzroka febrilnosti ili drugog kliničkog stanja. U daljem radu je ova grupa ispitanika služila kao kontrolna grupa bolesnicima od malarije.

### 4.3. ANALIZA REZULTATA DIJAGNOSTIKE MALARIJE PO METODAMA

#### 4.3.1. REZULTATI DOBIJENI KONVENCIONALNIM METODAMA

##### 4.3.1.1. Rezultati mikroskopije

Malarija je potvrđena mikroskopskim nalazom aseksualnih stadijuma plazmodijuma kod 42 bolesnika. Kod svih su paraziti uočeni već pregledom prvih uzoraka. I vrsta plazmodijuma je određena već na prvom mikroskopskom pregledu kod čak 41 bolesnika, dok je samo kod jednog bolesnika sa izuzetno retkim parazitima tek nakon trećeg uzorkovanja utvrđeno da je u pitanju *P. malariae*. Kod 29 (69,1%) bolesnika detektovan je *P. falciparum*, kod troje (7,1%) *P. vivax*, a kod po četvoro (9,5%) *P. ovale* i *P. malariae*. Kod dva bolesnika postavljena je dijagnoza mešane infekcije, i to u jednom slučaju *P. malariae* i *P. vivax*, a u drugom *P. falciparum* i *P. vivax* (Tabela 8).

Svi bolesnici sa mikroskopski potvrđenom malarijom su bili manifestni tj. sa simptomima bolesti. S druge strane, ni kod jednog od 67 (61,5%) ispitanika kod kojih malarija nije potvrđena mikroskopijom nisu nađeni ni seksualni stadijumi parazita. Među njima su i tri bolesnika kod kojih je dijagnoza malarije postavljena *ex iuvantibus*. Sva tri bolesnika započela su terapiju antimalaricima (Artequin®, artesunat, Coartem®).

**Tabela 8.** Rezultati mikroskopije kod 109 ispitanika pregledanih na prisustvo *Plasmodium* spp.

<i>mikroskopski nalaz</i>	<i>br</i>	<i>%</i>
pozitivan	42	38,5
<b><i>Plasmodium</i> spp.</b>		
<i>P. falciparum</i>	29	69,1
<i>P. vivax</i>	3	7,1
<i>P. ovale</i>	4	9,5
<i>P. malariae</i>	4	9,5
mešana infekcija	2 (Pm + Pv; Pf + Pv)	4,8
<b>Σ</b>	<b>42</b>	<b>100,0</b>

Skraćenice u tabeli: Pm - *P. malariae*; Pv - *P. vivax*; Pf - *P. falciparum*

Parazitemija je najčešće (n=14, 33,3%) bila vrlo niska 0,0001 - 0,0004%. Polovina ovih bolesnika već je bila započela terapiju antimalaricima i kod njih su uočavani poluraspadnuti paraziti. Četiri bolesnika imalo je parazitemiju između 2 i 5%, a najviša zabeležena parazitemija bila je 9,5%, i to u slučaju *P. falciparum* infekcije. Od 13 bolesnika sa malarijom koji su započeli terapiju pre javljanja na pregled, sedmero je imalo parazitemiju ispod 0,0004%, troje između 0,2 i 2% (Tabela 9) dok troje bolesnika nije imalo mikroskopski detektabilnu parazitemiju.

**Tabela 9.** Visina parazitemije kod 42 bolesnika sa mikroskopski dokazanom malarijom

<i>parazitemija u %</i>	<i>br</i>	<i>%</i>	<i>započeta th</i>	<i>vrsta antimalarika</i>
0,0001 - 0,0004%	14	33,3	7	5 Artequin®, 2 Coartem®
0,0004 - 0,002%	2	4,8	0	/
0,002 - 0,2%	10	23,8	0	/
0,2 - 2%	11	26,2	3	2 Coartem®, 1 Co-arinate®
2 - 5%	4	9,5	0	/
5 - 10%	1	2,4	0	/
Σ	42	100	10	/

Skraćenice u tabeli: Coartem® (artemetar + lumefantrin); Artequin® (artesunat + meflokin); Co-arinate® (artesunat-sulfametoksipirazin/pirimetamin)

Vreme dijagnostike metodom mikroskopije od uzorkovanja do izdavanja rezultata, uz poštovanje optimalnog vremena za svaki korak postupka, trajalo je između dva i tri sata. Koliko je tačno trajalo vreme mikroskopske dijagnostike zavisilo je i od tehničkih faktora kao što je npr sobna temperatura na kojoj su sušeni preparati, ali najviše od dužine samog mikroskopiranja koja je zavisila od kvaliteta preparata i brojnosti parazita, kao i od toga da li je postupak uključivao izračunavanje parazitemije.

Prvi uzorci su kod 21 (46,7%) bolesnika mikroskopski pregledani unutar radnog vremena, a kod 24 (53,3%) van radnog vremena kada su uzorkovanje vršili hematološki laboranti.

#### 4.3.1.2. Rezultati brzog antigenskog testa

Brzi antigenski test primenjen je kod 97 ispitanika. Rezultat je bio pozitivan kod 35 (36,1%) ispitanika, i to kod 29 sa mikroskopski dokazanom *P. falciparum* malarijom, tri bolesnika sa mikroskopski nepotvrđenom malarijom (*ex iuvantibus*) kao i kod tri zdrava ispitanika iz grupe epidemiološkog nadzora (Tabela 10), koji su uzimali antimalarike neposredno pre dolaska u zemlju. Kod jednog je 13 dana pre ispitivanja

završena terapija Coartem®-om, drugi je mesec dana pre ispitivanja lečen kininom a kod trećeg je lečenje završeno 9 dana pre ispitivanja (bez podatka o vrsti antimalarika).

Među 62 (63,9%) ispitanika kod kojih je brzi test bio negativan bilo je 49 mikroskopski negativnih ispitanika ali i 12 bolesnika kod kojih je nađena druga vrsta plazmodijuma (*ne-falciparum* malarija), kao i jedan sa mikroskopski proglašenom mešanom infekcijom (Pf + Pv) (Tabela 10).

Postupak izvođenja brzog testa, od uzorkovanja do izdavanja rezultata, trajao je oko 20 minuta.

**Tabela 10.** Rezultati brzog antigenskog testa kod 97 bolesnika ispitanih na prisustvo HRP2 antigena *P. falciparum*

<i>RDT</i>	<i>br (%)</i>
pozitivan	35 (36,1)
<b>pozitivan nalaz (n=35)</b>	<b>br</b>
mikroskopski Pf	29
submikroskopski Pf ( <i>ex iuvantibus</i> )	3
SPM	3
<b>negativan nalaz (n=62)</b>	<b>br</b>
mikroskopski negativan	49
<i>ne-falciparum</i> malarija	12
mikroskopski Pf + Pv	1

Skraćenice u tabeli: RDT - *rapid diagnostic test*; SPM - *status post malariam*; Pf - *P. falciparum*; Pv - *P. vivax*

#### 4.3.2. REZULTATI MOLEKULARNIH METODA U DIJAGNOSTICI MALARIJE

##### 4.3.2.1. Rezultati qPCR-a za detekciju roda *Plasmodium* (skrining qPCR)

###### 4.3.2.1.a. Validacija testa

Specifičnost skrining qPCR-a je proverena ispitivanjem četiri bolesnika sa drugim infekcijama, i u sva četiri slučaja je nalaz skrining qPCR-a bio negativan.

Nalaz skrining qPCR-a za 10 nasumično izabranih uzoraka ispitanih i u Parazitološkoj laboratoriji Univerzitetske bolnice u Remsu pokazao je 100% saglasnost sa našim nalazom (devet pozitivnih bilo je pozitivno, jedan negativan bio je negativan).

#### 4.3.2.1.b. Rezultati skrining qPCR-a u ispitivanoj populaciji

Skrining qPCR-om su analizirani inicijalni uzorci venske krvi svih 109 ispitanika.

Nalaz je bio pozitivan kod 51 (46,8%) bolesnika. Svi bolesnici sa pozitivnim mikroskopskim nalazom (n=42) bili su pozitivni i na skrining qPCR-u. Od tri bolesnika sa *ex iuvantibus* dijagnozom, dva su bila pozitivna a jedan negativan na skrining qPCR-u. Time je od 45 bolesnika sa malarijom dijagnoza potvrđena skrining PCR-om kod 44. Srednja  $C_T$  vrednost na skrining qPCR-u za 44 bolesnika sa dokazanom malarijom bila je  $25,64 \pm 5,9$  (16,97 - 39,47).

Skrining qPCR bio je pozitivan kod još sedam ispitanika, među kojima kod četvoro sa nedavno lečenom malarijom i dvoje sa ranije lečenom malarijom, dok jedan nije nikada ranije imao malariju.

Negativan nalaz na skrining qPCR-u imalo je 58 ispitanika, koji su svi bili negativni i na mikroskopiji. Međutim, dvoje među njima je imalo pozitivan nalaz na brzom antigenskom testu, zbog čega su, bez obzira na negativan nalaz skrining PCR-a, uključeni u molekularnu dijagnostiku do nivoa vrste (Tabela 11).

**Tabela 11.** Rezultati skrining qPCR kod 109 ispitanika pregledanih na prisustvo plazmodijuma

<i>skrining qPCR</i>	<i>br (%)</i>
pozitivan	51 (46,8)
<b>pozitivan nalaz (n=51)</b>	<b>br</b>
mikroskopski dokazan <i>Plasmodium</i>	42
<i>ex iuvantibus</i> dijagnoza malarije	2
nije dokazana malarija	7

#### 4.3.2.2. Rezultati qPCR-a za detekciju vrsta *Plasmodium* spp. (specijes-specifični qPCR)

##### 4.3.2.2.a. Validacija testa

Nije bilo pozitivnih nalaza u kontrolnoj grupi zdravih ispitanika koji nisu boravili u malaričnom području. Odsustvo lažno pozitivnih nalaza ukazuje na visoku specifičnost metode.

Poređenjem nalaza na specijes-specifičnom qPCR-u sa rezultatima 11 uzoraka ispitanih konvencionalnim PCR-om u Švedskoj, pokazalo se da su se nalazi ove dve

molekularne tehnike za identifikaciju vrsta plazmodijuma slagali u osam (72,7%) slučajeva. U tri preostala slučaja specijes-specifični qPCR bio je negativan, dok je konvencionalnim PCR-om u dva slučaja dokazan *P. ovale* (koji je bio uočen i mikroskopski), a u jednom slučaju, kod ispitanika sa nedavno lečenom malarijom, i *P. falciparum*.

#### 4.3.2.2.b. Rezultati specijes-specifičnog qPCR-a u ispitivanoj populaciji

Specijes-specifični qPCR urađen je kod 53 bolesnika svrstanih u dve grupe:

- a) Bolesnici sa pozitivnim nalazom na skrining qPCR-u nezavisno od nalaza mikroskopije i brzog antigenskog testa (n=51). Unutar ove grupe su se našli svi bolesnici koji su imali pozitivan nalaz mikroskopijom (n=42).
- b) Bolesnici sa negativnim nalazom skrining qPCR-a ali sa pozitivnim nalazom brzog antigenskog testa (n=2).

Specijes-specifični qPCR pokazao je pozitivan rezultat kod 43 od 53 bolesnika. Srednja  $C_T$  vrednost kod pozitivnih nalaza bila je  $26,33 \pm 5,6$  (18,60 - 38,20).

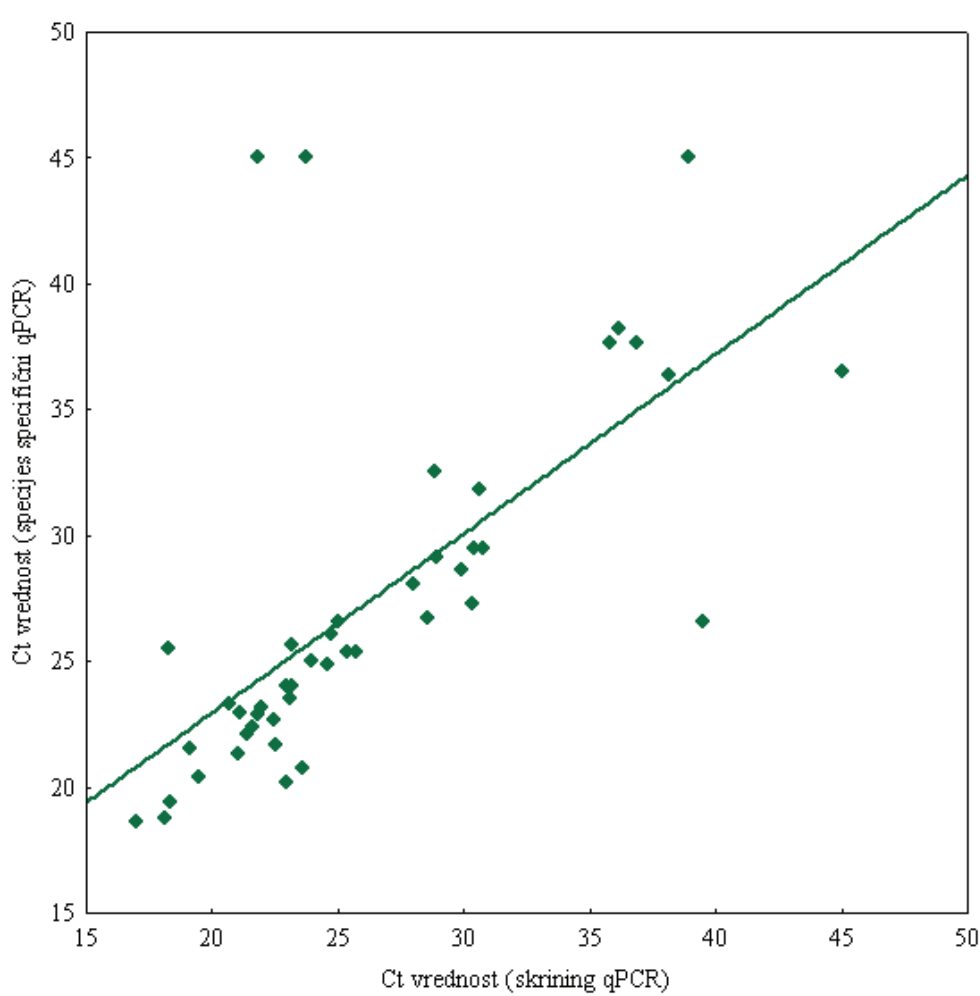
Među ispitanicima pozitivnim na specijes-specifičnom PCR-u, kod 33 (76,7%) nađen je *P. falciparum*, a srednja  $C_T$  vrednost bila je  $26,27 \pm 6,1$  (18,60 - 38,20). *P. ovale* nađen je kod četvoro (9,3%) bolesnika a srednja  $C_T$  vrednost bila je  $28,27 \pm 3,3$  (25,38 - 32,54). *P. vivax* detektovan je kod tri bolesnika sa srednjom  $C_T$  vrednošću od  $25,06 \pm 3,1$  (23,19 - 28,64). *P. malariae* nađen je kod tri (7,0%) bolesnika, a srednja  $C_T$  vrednost bila je  $25,67 \pm 3,7$  (22,11 - 29,51). Nije detektovana nijedna mešana infekcija (Tabela 12).

**Tabela 12.** Rezultati specijes-specifičnog qPCR-a kod 53 ispitivana bolesnika

<b>specijes-specifični qPCR</b>	<b>br</b>	<b>%</b>
pozitivan	43	81,1
<b><i>Plasmodium spp.</i></b>		
<i>P. falciparum</i>	33	76,7
<i>P. vivax</i>	3	7,0
<i>P. ovale</i>	4	9,3
<i>P. malariae</i>	3	7,0
mešana infekcija	0	0,0
<b>Σ</b>	<b>0</b>	<b>100,0</b>



Na grafikonu 1 prikazana je korelacija  $C_T$  vrednosti dobijenih skrining i specijes-specifičnim qPCR-om kod 45 bolesnika sa malarijom. Negativni nalazi su za potrebe analize računati sa  $C_T$  vrednošću 45 (maksimalan broj ciklusa u reakciji).



**Grafikon 1.** Korelacija  $C_T$  vrednosti dobijenih skrining i specijes-specifičnim qPCR-om za prvi ispitivani uzorak kod 45 bolesnika sa malarijom

Korelacija nalaza ove dve metode opisana je jednačinom  $y = 8,71 + 0,71x$ , i pokazano je da je stepen korelacije između ove dve metode umeren (Pirsonov koeficijent korelacije  $r=0,669$ ,  $P<0,001$ ,  $r^2=0,447$ ).

Kompletan postupak izvođenja qPCR-a uključujući ekstrakciju DNK, pripremu reakcione smeše, i izvođenje skrining i specijes-specifičnog qPCR-a do dobijanja rezultata, trajao je oko tri sata.

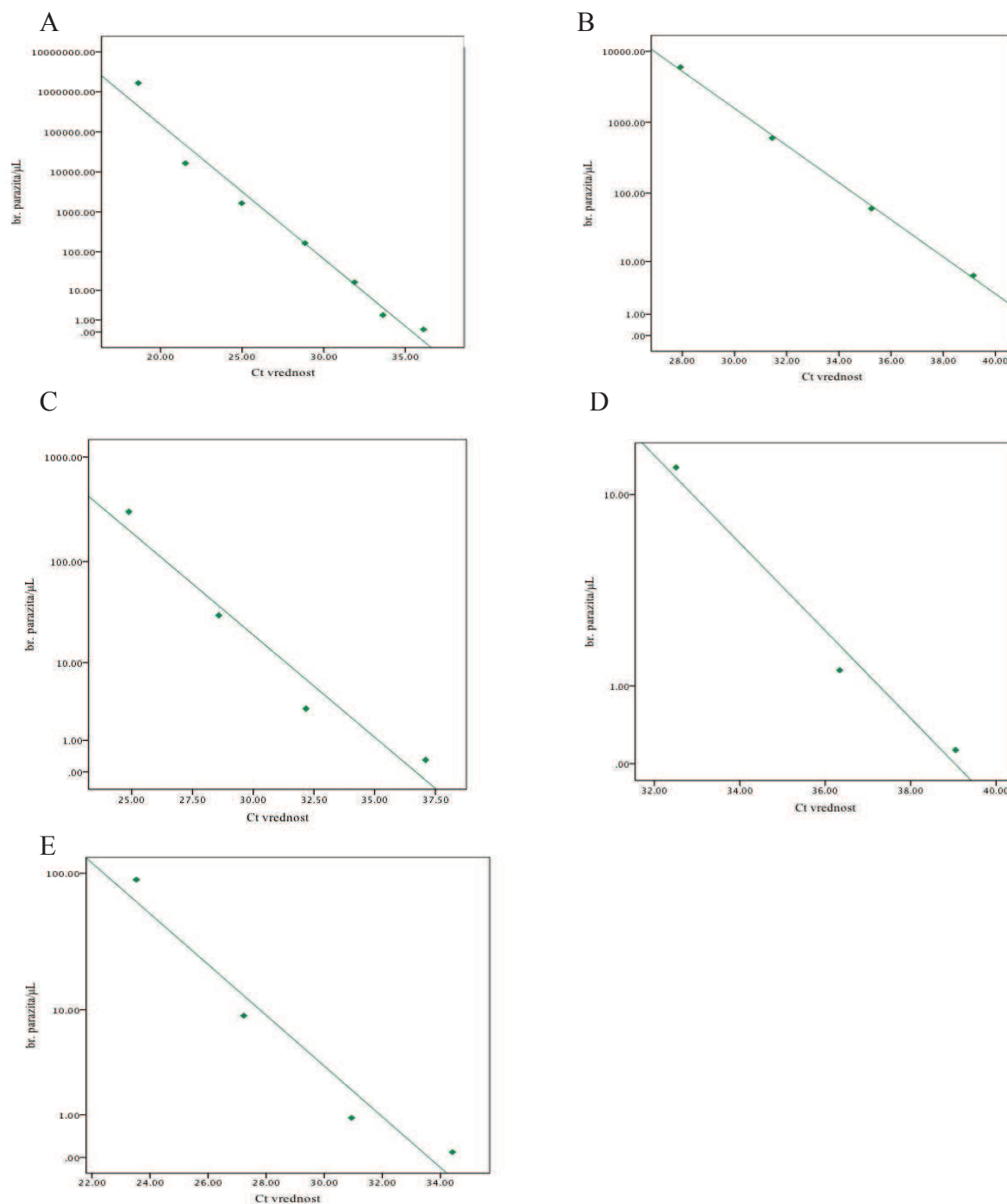
#### 4.3.2.3. Analitička osetljivost qPCR-a

Osetljivost skrining i specijes-specifičnog qPCR-a određivana je putem standardnih kriva dobijenih ispitivanjem desetstrukih razblaženja odgovarajućih pozitivnih kontrola (Grafikon 2).

Prag osetljivosti qPCR-a prikazan je u tabeli 13. Za skrining qPCR prag osetljivosti je bio 0,04 par/ $\mu$ L, dok je za specijes-specifični qPCR bio nešto viši; najniži je bio za *P. malariae* i iznosio je 0,09 par/ $\mu$ L a najviši za *P. falciparum* gde je iznosio čak 6 par/ $\mu$ L.

**Tabela 13.** Analitička osetljivost skrining i specijes-specifičnog qPCR-a

<i>dijagnostička metoda</i>	<i>prag (br. par/<math>\mu</math>L)</i>	<i>raspon <math>C_T</math> (br. par/<math>\mu</math>L)</i>
<b>skrining qPCR</b>	0,04	18,64 (41.250) - 36,11 (0,04)
<b>specijes-specifični qPCR</b>		
<i>P. falciparum</i>	6	27,93 (6.000) - 39,16 (6)
<i>P. vivax</i>	0,3	24,88 (300) - 37,09 (0,3)
<i>P. ovale</i>	0,13	32,52 (12,5) - 39,06 (0,13)
<i>P. malariae</i>	0,09	27,23 (9) - 34,42 (0,09)



**Grafikon 2.** Standardne krive za određivanje analitičke osjetljivosti skrining i specijes-specifičnog qPCR-a: (A) standardna kriva za skrining qPCR ( $r^2=0,989$ ); (B) standardna kriva za *P. falciparum* specifični qPCR ( $r^2=0,999$ ); (C) standardna kriva za *P. vivax* specifični qPCR ( $r^2=0,953$ ); (D) standardna kriva za *P. ovale* specifični qPCR ( $r^2=0,977$ ); (E) standardna kriva za *P. malariae* specifični qPCR ( $r^2=0,948$ )

#### 4.3.3. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA DIJAGNOSTIČKIH METODA PRIMENJENIH ZA DIJAGNOSTIKU MALARIJE

U tabeli 14 dat je uporedni prikaz rezultata dijagnostičkih metoda za 53 bolesnika ispitanih svim primenjenim metodama, uključujući i  $C_T$  vrednosti dobijene skrining i specijes-specifičnim qPCR-om.

**Tabela 14.** Uporedni prikaz rezultata različitih metoda za dijagnostiku malarije (n=53)

<i>r. br.</i>	<i>mikroskopija</i>	<i>RDT</i>	<i>skrining qPCR</i>	<i>specijes-specifični qPCR</i>		
	<i>Plasmodium spp.</i>	<i>+/-</i>	<i>+/-</i>	$C_T$	<i>Plasmodium spp.</i>	$C_T$
1	Pf	+	+	21,81	Pf	22,91
2	-	-	+	37,18	-	-
3	Pf	+	+	30,37	Pf	27,29
4	-	-	+	39,86	-	-
5	-	+	-	-	Pf	36,53
6	-	-	+	39,41	-	-
7	Pf	+	+	28,54	Pf	26,70
8	Pf	+	+	25,00	Pf	26,57
9	Pf	+	+	18,27	Pf	25,48
10	Pv	-	+	38,92	-	-
11	Pf	+	+	30,63	Pf	31,83
12	-	-	+	39,62	-	-
13	Pv	-	+	24,71	Po	26,05
14	Pf	+	+	21,06	Pf	21,33
15	Pf	+	+	22,98	Pf	24,01
16	Pf	+	+	19,13	Pf	21,55
17	Pf	+	+	16,97	Pf	18,60
18	-	+	+	35,36	Pf	38,00
19	Po	-	+	21,97	Pv	23,19
20	Pf	+	+	23,14	Pf	25,69
21	Pf	+	+	19,44	Pf	20,39
22	Pf	+	+	18,12	Pf	18,76
23	Pm	-	+	21,37	Pm	22,11
24	Pf	+	+	21,10	Pf	22,96
25	Pf	+	+	18,32	Pf	19,40
26	Pm/Pv	-	+	25,37	Pm	25,40
27	-	+	+	37,73	-	-

r. br.	mikroskopija	RDT	skrining qPCR	specijes-specifični qPCR		
	<i>Plasmodium</i> spp.	+/-	+/-	C <sub>T</sub>	<i>Plasmodium</i> spp.	C <sub>T</sub>
28	Pf	+	+	23,94	Pf	24,98
29	Pf	+	+	23,17	Pf	24,03
30	Pm	-	+	25,74	Po	25,38
31	Po	-	+	23,75	- *	-
32	Pf	+	+	21,60	Pf	22,37
33	Po	-	+	21,80	- *	-
34	Pm	-	+	30,43	Pm	29,51
35	Po	-	+	28,83	Po	32,54
36	-	+	+	35,79	Pf	37,63
37	Pf	+	+	22,53	Pf	21,70
38	Pm	-	+	28,94	Po	29,14
39	-	+	+	38,12	Pf	36,37
40	Pf	+	+	22,94	Pf	20,19
41	Pf	+	+	39,47	Pf	26,59
42	-	-	+	39,64	-	-
43	Pf	+	+	22,45	Pf	22,67
44	Pf	+	+	36,84	Pf	37,63
45	Pf	+	+	30,75	Pf	29,47
46	Pf	+	+	23,60	Pf	20,76
47	Pf	+	+	23,06	Pf	23,52
48	-	+	-	-	-	-
49	Pf/Pv	-	+	29,92	Pv	28,64
50	Pf	+	+	24,60	Pf	24,89
51	Pf	+	+	36,19	Pf	38,20
52	Pf	+	+	28,00	Pf	28,09
53	Pv	-	+	20,68	Pv	23,34

Skraćenice u tabeli: Pf - *P. falciparum*; Pv - *P. vivax*; Po - *P. ovale*; Pm - *P. malariae*; \*u našoj laboratoriji negativni na specijes-specifičnom qPCR-u, u bolnici Karolinska u Švedskoj pozitivni na *P. ovale* konvencionalnim PCR-om

Kod bolesnika sa oprečnim rezultatima između mikroskopije i specijes-specifičnog qPCR-a u pogledu vrste plazmodijuma, kao i u slučaju neslaganja rezultata sa nalazima konvencionalnog PCR-a u Švedskoj, izvršeno je bojenje i mikroskopiranje rezervnih preparata a ponovljena je i mikroskopija prvih uzoraka.

U tabeli 15 dat je pojedinačni prikaz nepoklapanja u identifikaciji vrsta plazmodijuma metodama mikroskopije i specijes-specifičnog qPCR-a. Zabeleženo je 12 (26,7%) diskrepantnih rezultata; pokazalo se da je kod šest (13,3%) bolesnika mikroskopijom načinjena greška u identifikaciji vrste. U oba slučaja koji su mikroskopski identifikovani kao mešane infekcije radilo se o mono infekciji, pri čemu

je po jedna vrsta bila tačno određena. U dva (4,4%) slučaja došlo je do zamena vrste *P. ovale* i *P. vivax*, a u dva (4,4%) slučaja zamenjen je *P. ovale* sa *P. malariae*. Sem ovih 12 slučajeva nepoklapanja vrsta zabeležen je i jedan mikroskopski negativan slučaj, kod koga je specijes-specifičnim qPCR-om detektovan *P. falciparum*. Ovo je bio lažno pozitivan nalaz kod bolesnika sa nedavno lečenom malarijom.

**Tabela 15.** Analiza oprečnih rezultata u pogledu vrste plazmodijuma mikroskopijom i specijes-specifičnim qPCR-om kod 12 bolesnika sa malarijom

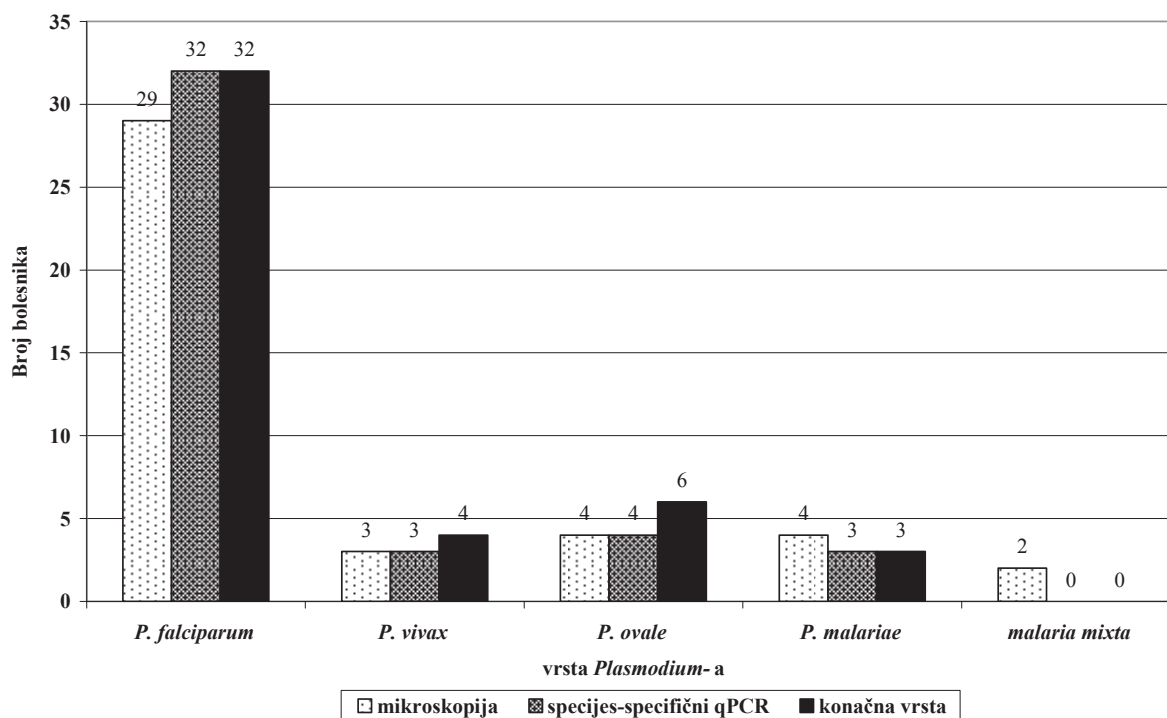
metoda	specijes-specifični qPCR						Σ
	Pf	Pv	Po	Pm	mešana inf.	negativan	
mikroskopija							
Pf							0
Pv			1			1	2
Po		1				2	3
Pm			2				2
mešana inf.		1*		1**			2
negativan	3						3
Σ	3	2	3	1	0	3	12

Skraćenice u tabeli: Pf - *P. falciparum*; Pv - *P. vivax*; Po - *P. ovale*; Pm - *P. malariae*. \*mikroskopski mešana infekcija Pf + Pv konačno je bila Pv; \*\*mikroskopski mešana infekcija Pm + Pv konačno je bila Pm

Podudaranje mikroskopije i specijes-specifičnog qPCR-a za 45 bolesnika sa malarijom bilo je 73,3% (33/45). Po vrstama, za *P. falciparum* podudaranje je bilo 90,6% (29/32), za *P. vivax* 25% (1/4), za *P. ovale* svega 16,7% (1/6) i za *P. malariae* 66,7% (2/3).

Pošto nijedna od primenjenih metoda nije imala apsolutnu tačnost, završna dijagnoza malarije postavljena je na osnovu rezultata mikroskopije, brzog antigenskog testa, skrining i specijes-specifičnog qPCR-a, uz uvažavanje kliničkog stanja bolesnika. Na ovaj način je u ispitivanoj grupi (n=109) završna dijagnoza malarije postavljena kod 45 bolesnika (Grafikon 3).

Završnu dijagnozu *P. falciparum* infekcije imalo je 71,1% bolesnika uključujući i troje bez mikroskopske potvrde, *P. vivax* dijagnostikovano je u 8,9% slučajeva, *P. ovale* u 13,3% a *P. malariae* u 6,7% slučajeva.



**Grafikon 3.** Identifikacija vrste *Plasmodium* spp. mikroskopijom i specijes-specifičnim qPCR-om u odnosu na konačnu identifikaciju vrste kod 45 bolesnika sa malarijom

Na osnovu rezultata specijes-specifičnog qPCR-a, kod osam ispitanika (sedam pozitivnih na skrining qPCR-u i jedan samo na brzom testu) isključena je malarija (Tabela 16).

**Tabela 16.** Nalazi različitih dijagnostičkih metoda kod ispitanika kod kojih je na osnovu rezultata specijes-specifičnog qPCR-a isključena malarija (n=8)

<i>r. broj</i>	<i>mikroskopija</i>	<i>RDT</i>	<i>skrining qPCR</i>	<i>skrining qPCR</i>	<i>specijes-specifični qPCR</i>
	+/-	+/-	+/-	C <sub>T</sub>	<i>Plasmodium</i> spp.
1	2x -	-	+	37,18	-
2	1x -	-	+	39,86	-
3	4x -	-	+	39,41	-
4	3x -	-	+	39,62	-
5	1x -	+	+	35,36	+ Pf (Ct - 38,00)
6	3x -	+	+	37,73	-
7	3x -	-	+	39,64	-
8	4x -	+	-	-	-

Srednja  $C_T$  vrednost za sedam ispitanika kod kojih je isključena malarija a koji su bili pozitivni na skrining qPCR-u bila je  $38,40 \pm 1,7$  (35,36 - 39,86), što je značajno više ( $P < 0,03$ ) od srednje  $C_T$  vrednosti na skrining qPCR-u za bolesnike sa malarijom od  $25,64 \pm 5,9$  (16,97 - 39,47). Kod tri ispitanika (br. 2, 4, 7)  $C_T$  vrednost je bila čak i  $> 39,6$ .

Sedam bolesnika ranije je imalo malariju; kod četvoro se radilo o nedavno lečenoj a kod troje o ranije lečenoj malariji. Kod jednog bolesnika (br. 5) malarija je isključena uprkos pozitivnim nalazima sva tri testa jer je klinički bio zdrav (Tabela 17).

**Tabela 17.** Karakteristike osam ispitanika (sedam pozitivnih na skrining qPCR-u i jedan samo na brzom testu) kod kojih je specijes-specifičnim qPCR-om isključena malarija

<i>redni broj</i>	<i>uputna dijagnoza</i>	<i>vreme od prethodne epizode malarije</i>	<i>terapija prethodne malariju</i>	<i>završna dijagnoza</i>
1	SPM	7 dana	artesanat	SPM
2	SPM, <i>Leukocytosis</i>	5 god	*	Obs**
3	SPM, <i>St. febrilis</i>	7 mes	*	SPM, <i>St. febrilis</i>
4	<i>St. febrilis</i>	nije imao malariju	/	<i>Influenza B</i>
5	SPM	13 dana	Coartem®	SPM
6	SPM	30 dana	kinin	SPM
7	SPM, <i>Malaria in obs</i>	11 meseci	*	<i>Virosis</i>
8	SPM, <i>Malaria in obs</i>	9 dana	Malarone®	SPM, <i>Mycoplasma pneumoniae seropositiva</i>

Skraćenice u tabeli: SPM - *status post malariam*; *St. febrilis* - *status febrilis*; Obs - *observatio*; \*nedostaje podatak; \*\*zbog leukocitoze pred ugradnju stenta upućen na ispitivanje na malariju zbog boravka u E. Gvineji pre 5 godina gde je imao malariju. Preporučeno dalje ispitivanje uzroka leukocitoze

Završne dijagnoze za 64 ispitanika kod kojih je malarija isključena prikazane su u tabeli 18. Među njima, 26 ispitanika je došlo s dijagnozom *status post malariam*, od kojih je 14 na prijemu imalo tegobe, za koje je naknadno utvrđena druga etiologija. Među uzrocima bolesti ostalih 38 bolesnika dominirale su virusne respiratorne infekcije gornjih disajnih puteva (n=7), crevne infekcije i bronhopneumonija (n=4).



**Tabela 18.** Završne dijagnoze kod 64 ispitanika kod kojih je malarija isključena

<i>završne dijagnoze kod 64 ispitanika bez malarije</i>	<i>br</i>	<i>%</i>
epidemiološki nadzor (uključujući 10 SPM bez tegoba)	12	18,8
SPM (sa tegobama pri prijemu) *	7	10,9
SPM i druga bolest**	7	10,9
druga bolest	38	59,4
<b>druga bolest</b>		
bez konačne dijagnoze	8	
virusne respiratorne infekcije gornjih disajnih puteva	7	
bronhopneumonija	5	
crevne infekcije	4	
nejasna febrilna stanja	3	
urinarne infekcije	2	
faringitis	2	
sinuzitis	2	
Stilova bolest	1	
filarioza	1	
borelioza	1	
vaskulitis	1	
furunkul na glavi	1	

Skraćenice u tabeli: SPM - *status post malariam*; \*tegobe u sklopu nedavno lečene malarije; \*\*viroza (n=2), 1 urinarna infekcija, 1 *status febrilis*, 1 *coxarthrosis gravis*, 1 bronhopneumonija, 1 *Mycoplasma pneumoniae*

#### 4.3.4. ANALIZA USPEŠNOSTI PRIMENJENIH METODA U DIJAGNOSTICI MALARIJE

**Tabela 19.** Komparativna analiza performansi metoda primenjenih za dijagnostiku malarije

	<i>mikroskopija*</i> <i>(n=109)</i>		<i>RDT**</i> <i>(n=97)</i>		<i>skrining</i> <i>qPCR (n=109)</i>		<i>specijes-specifični</i> <i>qPCR (n=53)</i>	
	+	-	+	-	+	-	+	-
<b>bolesnici sa malarijom (n=45)</b>	42	3	32	0	44	1	42	3
<b>ispitanici bez malarije (n=64)</b>	0	64	3	62	7	57	1	7
<b>osetljivost</b>	93,3		100,0		97,8		93,3	
<b>specifičnost</b>	100,0		95,4		89,1		87,5	
<b>PPV</b>	100,0		91,4		86,3		97,7	
<b>NPV</b>	95,5		100,0		98,3		70,0	

Skraćenice u tabeli: \*performanse za detekciju roda *Plasmodium*; \*\*performanse za *P. falciparum*; PPV - pozitivna prediktivna vrednost; NPV - negativna prediktivna vrednost

U tabeli 19 prikazani su osetljivost, specifičnost, PPV i NPV svih primenjenih metoda (izračunatih prema ukupnom broju bolesnika ispitanih određenom metodom). Osetljivost brzog testa bila je 100% a mikroskopije i specijes-specifičnog qPCR-a po 93,3%, pri čemu je osetljivost mikroskopije zasnovana samo na detekciji roda a ne i na tačnosti u identifikaciji vrste roda *Plasmodium*.

Da bismo analizirali uspešnost primenjenih metoda, prvo je izvršeno njihovo međusobno poređenje, a zatim su njihovi rezultati upoređeni sa završnom dijagnozom malarije.

#### 4.3.4.1. Rezultati poređenja metoda u dijagnostici malarije

Poređenjem mikroskopije sa skrining qPCR-om kod 109 ispitanika pokazano je gotovo savršeno slaganje ove dve metode ( $k=0,83$ ,  $P<0,001$ ). Stvarno slaganje je 91,7%, osetljivost i NPV su 100,0%, specifičnost 86,6% a PPV 82,4% (Tabela 20).

**Tabela 20.** Slaganje skrining qPCR-a sa rezultatima mikroskopije (n=109)

<i>mikroskopija</i>				
skrining qPCR		poz	neg	Σ
	poz	42	9	51
	neg	0	58	58
	Σ	42	67	109

<i>parametri slaganja rezultata mikroskopije sa skrining qPCR</i>		
	%	95% IP
osetljivost	100,0	91,5 - 100
specifičnost	86,6	76,0 - 93,7
PPV	82,4	69,1 - 91,6
NPV	100,0	93,8 - 100
stvarno slaganje	91,7	/
<i>kappa</i>	0,83	0,73 - 0,94
<i>P za kappa</i>	<0,001	/

Skraćenice u tabeli: PPV - pozitivna prediktivna vrednost; NPV - negativna prediktivna vrednost; IP - interval poverenja

Poređenje rezultata skrining qPCR-a i završne dijagnoze malarije kod 109 ispitanika pokazalo je gotovo savršeno slaganje ( $k=0,85$ ,  $P<0,001$ ), sa 92,7% stvarnog slaganja. Osetljivost je bila 97,8%, specifičnost 89,1%, PPV 86,3% i NPV 98,3% (Tabela 21).

**Tabela 21.** Slaganje rezultata skrining qPCR-a sa završnom dijagnozom malarije (n=109)

<i><b>završna dijagnoza malarije</b></i>				
<b>skrining qPCR</b>		poz	neg	$\Sigma$
		poz	44	7
	neg	1	57	58
	$\Sigma$	45	64	109

<i><b>parametri slaganja skrining qPCR sa završnom dijagnozom malarije</b></i>		
	%	95% IP
osetljivost	97,8	88,2 - 99,6
specifičnost	89,1	78,8 - 95,5
PPV	86,3	73,7 - 94,3
NPV	98,3	90,7 - 99,7
stvarno slaganje	92,7	/
<i>kappa</i>	0,85	0,75 - 0,95
<i>P za kappa</i>	<0,001	/

Skraćenice u tabeli: PPV - pozitivna prediktivna vrednost; NPV - negativna prediktivna vrednost; IP - interval poverenja

Poređenjem rezultata specijes-specifičnog qPCR-a sa završnom dijagnozom malarije kod sva 53 bolesnika kod kojih je urađen specijes-specifični qPCR pokazano je znatno slaganje ( $k=0,73$ ,  $P<0,001$ ), uz stvarno slaganje od 92,4%. Osetljivost je bila 93,3%, specifičnost 87,5%, PPV 97,7% i NPV 70,0% (Tabela 22).

U dva slučaja mikroskopski mešanih infekcija (Pm + Pv, konačna vrsta Pm; Pf + Pv, konačna vrsta Pv) vrste plazmodijuma analizirane su pojedinačno (Pm→Pm i Pv→Pm odnosno Pf→Pv i Pv→Pv) u proceni slaganja rezultata mikroskopije i specijes-specifičnog qPCR-a za sve četiri vrste plazmodijuma.

**Tabela 22.** Slaganje specijes-specifičnog qPCR-a sa završnom dijagnozom malarije (n=53)

<i>završna dijagnoza malarije</i>				
specijes-specifični qPCR		poz	neg	Σ
		poz	42	1
	neg	3	7	10
	Σ	45	8	53

<i>parametri slaganja specijes-specifičnog qPCR sa završnom dijagnozom malarije</i>		
	%	95% IP
osetljivost	93,3	81,7 - 98,5
specifičnost	87,5	47,4 - 97,9
PPV	97,7	87,7 - 99,6
NPV	70,0	34,8 - 93,0
stvarno slaganje	92,4	/
<i>kappa</i>	0,73	0,49 - 0,98
<i>P za kappa</i>	<0,001	/

Skraćenice u tabeli: PPV - pozitivna prediktivna vrednost; NPV - negativna prediktivna vrednost; IP - interval poverenja

Rezultati poređenja specijes-specifičnog qPCR-a sa mikroskopijom za identifikaciju vrsta *Plasmodium* spp. pokazuju znatno slaganje ( $k=0,62$ ,  $P<0,001$ ) ove dve metode. Stvarno slaganje bilo je 76,4% (Tabela 23).

**Tabela 23.** Slaganje rezultata specijes-specifičnog qPCR-a sa mikroskopijom za identifikaciju vrsta *Plasmodium* spp. (n=55)

<i>specijes-specifični qPCR</i>							
vrste <i>Plasmodium</i> spp.		Pf	Po	Pm	Pv	neg	Σ
mikroskopska identifikacija vrsta	Pf	29	0	0	1	0	<b>30</b>
	Po	0	1	0	1	2	<b>4</b>
	Pm	0	2	3	0	0	<b>5</b>
	Pv	0	1	1	2	1	<b>5</b>
	neg	4	0	0	0	7	<b>11</b>
	Σ	<b>33</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>10</b>	<b>55</b>

Skraćenice u tabeli: Pf - *P. falciparum*; Pv - *P. vivax*; Po - *P. ovale*; Pm - *P. malariae*

<i>parametri slaganja specijes-specifičnog qPCR-a sa mikroskopskom identifikacijom vrste Plasmodium spp.</i>		
	%	95% IP
stvarno slaganje	76,4	/
<i>kappa</i>	0,62	0,46 - 0,78
<i>P za kappa</i>	<0,001	/

Skraćenica u tabeli: IP - interval poverenja

#### 4.3.4.2. Rezultati poređenja metoda u dijagnostici malarije po vrstama roda *Plasmodium*

##### 4.3.4.2.a. Rezultati poređenja metoda za identifikaciju *P. falciparum*

Poređenjem rezultata *P. falciparum*-specifičnog qPCR-a sa mikroskopskom identifikacijom *P. falciparum* pokazano je gotovo savršeno slaganje ( $k=0,82$ ,  $P<0,001$ ), uz stvarno slaganje od 90,9%. Osetljivost je bila 87,9%, specifičnost 95,5%, PPV 96,7% a NPV 84,0% (Tabela 24).

**Tabela 24.** Slaganje rezultata mikroskopske identifikacije *P. falciparum* sa *P. falciparum*-specifičnim qPCR-om (n=55)

<i>P. falciparum</i> -specifični qPCR				
		poz	neg	Σ
mikroskopska identifikacija <i>P. falciparum</i>	poz	30	1	31
	neg	4	21	25
	Σ	34	22	55

parametri slaganja <i>P. falciparum</i> -specifičnog qPCR-a sa mikroskopskom identifikacijom <i>P. falciparum</i>		
	%	95% IP
osetljivost	87,9	71,8 - 96,5
specifičnost	95,5	77,1 - 99,2
PPV	96,7	82,7 - 99,4
NPV	84,0	63,9 - 95,4
stvarno slaganje	90,9	/
<i>kappa</i>	0,82	0,66 - 0,97
<i>P</i> za <i>kappa</i>	<0,001	/

Skraćenice u tabeli: PPV - pozitivna prediktivna vrednost; NPV - negativna prediktivna vrednost; IP - interval poverenja

Vrste plazmodijuma kod dve mikroskopski mešane infekcije analizirane su pojedinačno u proceni slaganja mikroskopske identifikacije *P. falciparum* sa RDT za identifikaciju *P. falciparum*. Rezultati poređenja mikroskopije sa brzim testom za identifikaciju HRP2 antigena *P. falciparum* pokazuju gotovo savršeno slaganje ( $k=0,84$ ,  $P=0,001$ ). Stvarno slaganje je 92,9%, osetljivost 96,7%, specifičnost 91,3%, PPV 82,9% i NPV 98,4% (Tabela 25).

**Tabela 25.** Slaganje rezultata mikroskopske identifikacije *P. falciparum* sa brzim testom za *P. falciparum* (n=99)

<i>mikroskopija za detekciju P. falciparum</i>				
<b>RDT za identifikaciju <i>P. falciparum</i></b>		poz	neg	$\Sigma$
	poz	29	6	35
	neg	1	63	64
	$\Sigma$	30	69	99

<i>parametri slaganja mikroskopske identifikacije P. falciparum sa RDT za P. falciparum</i>		
	%	95% IP
osetljivost	96,7	82,7 - 99,4
specifičnost	91,3	82,0 - 96,7
PPV	82,9	66,3 - 93,4
NPV	98,4	91,6 - 99,7
stvarno slaganje	92,9	/
<i>kappa</i>	0,84	0,73 - 0,95
<i>P</i> za <i>kappa</i>	0,001	/

Skraćenice u tabeli: PPV - pozitivna prediktivna vrednost; NPV - negativna prediktivna vrednost; IP - interval poverenja

**Tabela 26.** Rezultati poređenja specijes-specifičnog qPCR-a za detekciju *P. falciparum* sa brzim testom za identifikaciju HRP2 antigena *P. falciparum* (n=53)

<i>P. falciparum-specifični qPCR</i>				
<b>RDT za <i>P. falciparum</i></b>		poz	neg	$\Sigma$
	poz	33	2	35
	neg	0	18	18
	$\Sigma$	33	20	53

<i>parametri slaganja P. falciparum-specifičnog qPCR-a sa RDT za P. falciparum</i>		
	%	95% IP
osetljivost	100,0	89,3 - 100,0
specifičnost	90,0	68,3 - 98,5
PPV	94,3	80,8 - 99,1
NPV	100,0	81,3 - 100,0
stvarno slaganje	96,2	/
<i>kappa</i>	0,92	0,81 - 1,0
<i>P</i> za <i>kappa</i>	0,001	/

Skraćenice u tabeli: PPV - pozitivna prediktivna vrednost; NPV - negativna prediktivna vrednost; IP - interval poverenja

Rezultati poređenja *P. falciparum*-specifičnog qPCR-a sa brzim testom za identifikaciju HRP2 antigena *P. falciparum* kod 53 bolesnika pokazuju gotovo savršeno slaganje ( $k=0,92$ ,  $P=0,001$ ). Stvarno slaganje je 96,2%, osetljivost i NPV su po 100,0%, specifičnost 90,0% i PPV 94,3% (Tabela 26).

#### 4.3.4.2.b. Rezultati poređenja metoda za identifikaciju *P. vivax*

Poređenjem *P. vivax*-specifičnog qPCR-a sa mikroskopskom identifikacijom *P. vivax* pokazano je umereno slaganje ( $k=0,40$ ,  $P=0,003$ ). Stvarno slaganje je 90,9%, dok su osetljivost 50,0%, specifičnost 94,1%, PPV 40,0% i NPV 96,0% (Tabela 27).

**Tabela 27.** Rezultati poređenja *P. vivax*-specifičnog qPCR-a sa mikroskopskom identifikacijom *P. vivax* (n=55)

<i>P. vivax</i> -specifični qPCR				
mikroskopska identifikacija <i>P. vivax</i>		poz	neg	Σ
	poz	2	3	5
	neg	2	48	50
	Σ	4	51	55

parametri slaganja <i>P. vivax</i> -specifičnog qPCR-a sa mikroskopskom identifikacijom <i>P. vivax</i>		
	%	95% IP
osetljivost	50,0	8,3 - 91,7
specifičnost	94,1	83,7 - 98,7
PPV	40,0	6,5 - 84,6
NPV	96,0	86,2 - 9,4
stvarno slaganje	90,9	/
<i>kappa</i>	0,40	-0,03 - 0,82
<i>P</i> za <i>kappa</i>	0,003	/

Skraćenice u tabeli: PPV - pozitivna prediktivna vrednost; NPV - negativna prediktivna vrednost; IP - interval poverenja

4.3.4.2.c. Rezultati poređenja metoda za identifikaciju *P. ovale*

Rezultati poređenja *P. ovale*-specifičnog qPCR-a sa mikroskopskom identifikacijom *P. ovale* pokazuju nezatno slaganje ( $k=0,19$ ,  $P=0,156$ ) ove dve metode. Stvarno slaganje je 89,1%, ali su osetljivost i PPV niski i iznose 25,0%, dok su specifičnost i NPV po 94,1% (Tabela 28).

**Tabela 28.** Rezultati poređenja *P. ovale*-specifičnog qPCR-a sa mikroskopskom identifikacijom *P. ovale* (n=55)

<i>P. ovale</i> -specifični qPCR				
mikroskopska identifikacija <i>P. ovale</i>		poz	neg	$\Sigma$
	poz	1	3	4
	neg	3	48	51
	$\Sigma$	4	51	55

<i>parametri slaganja P. ovale</i> -specifičnog qPCR-a sa mikroskopskom identifikacijom <i>P. ovale</i>		
	%	95% IP
osetljivost	25,0	4,1 - 79,7
specifičnost	94,1	83,7 - 98,7
PPV	25,0	4,1 - 79,7
NPV	94,1	83,7 - 98,7
stvarno slaganje	89,1	/
<i>kappa</i>	0,19	od -0,26 - 0,61
<i>P</i> za <i>kappa</i>	0,156	/

Skraćenice u tabeli: PPV - pozitivna prediktivna vrednost; NPV - negativna prediktivna vrednost; IP - interval poverenja

4.3.4.2.d. Rezultati poređenja metoda za identifikaciju *P. malariae*

Poređenjem *P. malariae*-specifičnog qPCR-a sa mikroskopskom identifikacijom *P. malariae* pokazano je znatno slaganje ( $k=0,64$ ,  $P<0,001$ ). Stvarno slaganje je 94,6%, osetljivost 75,0%, specifičnost 96,1%, PPV 60,0% i NPV 98,0% (Tabela 29).



**Tabela 29.** Rezultati poređenja *P. malariae*-specifičnog qPCR-a sa mikroskopskom identifikacijom *P. malariae* (n=55)

<i>P. malariae</i> -specifični qPCR				
mikroskopija		poz	neg	Σ
za identifikaciju <i>P. malariae</i>	poz	3	2	5
	neg	1	49	50
	Σ	4	51	55

<i>parametri slaganja P. malariae</i> -specifičnog qPCR-a sa mikroskopskom identifikacijom <i>P. malariae</i>		
	%	95% IP
osetljivost	75,0	20,3 - 95,9
specifičnost	96,1	86,5 - 99,4
PPV	60,0	15,4 - 93,5
NPV	98,0	89,3 - 99,7
stvarno slaganje	94,6	/
<i>kappa</i>	0,64	0,26 - 1,02
<i>P</i> za <i>kappa</i>	<0,001	/

Skraćenice u tabeli: PPV - pozitivna prediktivna vrednost; NPV - negativna prediktivna vrednost; IP - interval poverenja

#### 4.4. UPOREDNA ANALIZA TRAJANJA PARAZITEMIJE I DNK-nemije

Kinetika DNK praćena je skrining qPCR-om, ispitivanjem uzastopnih uzoraka bolesnika koji su bili pozitivni na mikroskopiji i/ili skrining qPCR-u. Ukupno je ispitano 322 uzorka od 45 bolesnika sa malarijom (srednji broj uzoraka po bolesniku 7,15).

U tabeli 30 dat je uporedni prikaz dužine trajanja parazitemije (u danima) detektovane mikroskopski i dužine registrovanja DNK plazmodijuma (DNK-nemije) detektovane skrining qPCR-om kod svih 45 bolesnika sa dijagnostikovanom malarijom. Maksimalno trajanje parazitemije bilo je 5 dana a DNK-nemije  $\geq 28$  dana, oba u slučaju infekcije sa *P. falciparum*. Srednje trajanje parazitemije bilo je  $2,2 \pm 1,2$  (0 - 7), a DNK-nemije  $7,9 \pm 6,5$  (0 - 28), pokazujući statistički visoko značajno dužu DNK-nemiju ( $P < 0,001$ ).

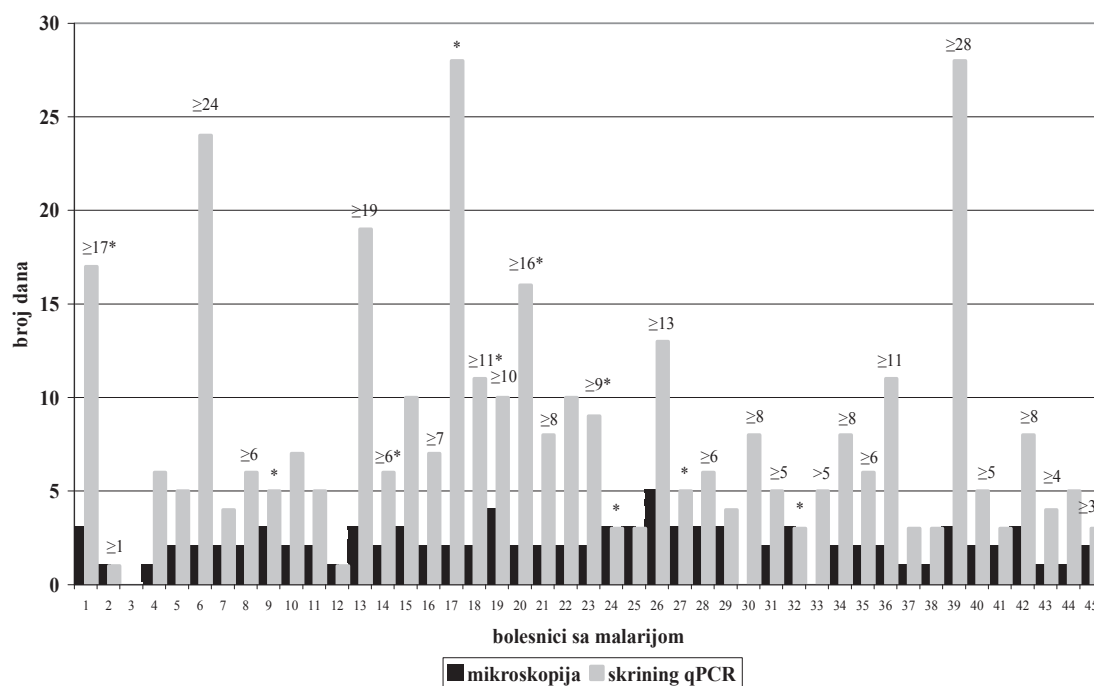
Duže trajanje DNK-nemije u odnosu na parazitemiju bilo je posebno upadljivo u slučaju infekcije *P. falciparum*-om, gde je srednje trajanje parazitemije bilo 1,9 dana a DNK-nemije 9,2 dana ( $P < 0,001$ ). Kod ostalih vrsta roda *Plasmodium* nije bilo statistički značajnih razlika ( $P > 0,05$ ) u trajanju parazitemije i DNK-nemije; tako je npr u slučaju infekcije *P. vivax*-om mikroskopski detektibilna parazitemija trajala 2,3 dana a DNK-nemija četiri dana. Parazitemija *P. ovale* trajala je tri dana a DNK-nemija 3,8 dana, dok je parazitemija za *P. malariae* trajala 4 dana a DNK-nemija 8,3 dana.

**Tabela 30.** Trajanje parazitemije i DNK-nemije (u danima) kod 45 bolesnika sa malarijom

	<i>P. falciparum</i> (n=32)*	<i>P. vivax</i> (n=4)	<i>P. ovale</i> (n=6)	<i>P. malariae</i> (n=3)	$\Sigma$ (n=45)
	$\bar{x} \pm SD$ (raspon)	$\bar{x} \pm SD$ (raspon)	$\bar{x} \pm SD$ (raspon)	$\bar{x} \pm SD$ (raspon)	$\bar{x} \pm SD$ (raspon)
<b>parazitemija</b>	1,9 $\pm$ 1,0 (0 - 5)	2,3 $\pm$ 0,5 (2)	3,0 $\pm$ 0,6 (3)	4,0 $\pm$ 2,7 (2 - 3)	2,2 $\pm$ 1,2 (0 - 5)
<b>DNK-nemija</b>	9,2 $\pm$ 7,2 (0 - 28)	4,0 $\pm$ 1,4 (3 - 6)	3,8 $\pm$ 1 (3 - 5)	8,3 $\pm$ 2,5 (6 - 11)	7,9 $\pm$ 6,5 (0 - 28)
<b>P</b>	<0,001	0,059	0,111	0,109	<0,001

Skraćenice u tabeli:  $\bar{x}$  - srednja vrednost; SD - standardna devijacija; \*29 mikroskopski pozitivnih i 3 *ex iuvantibus*

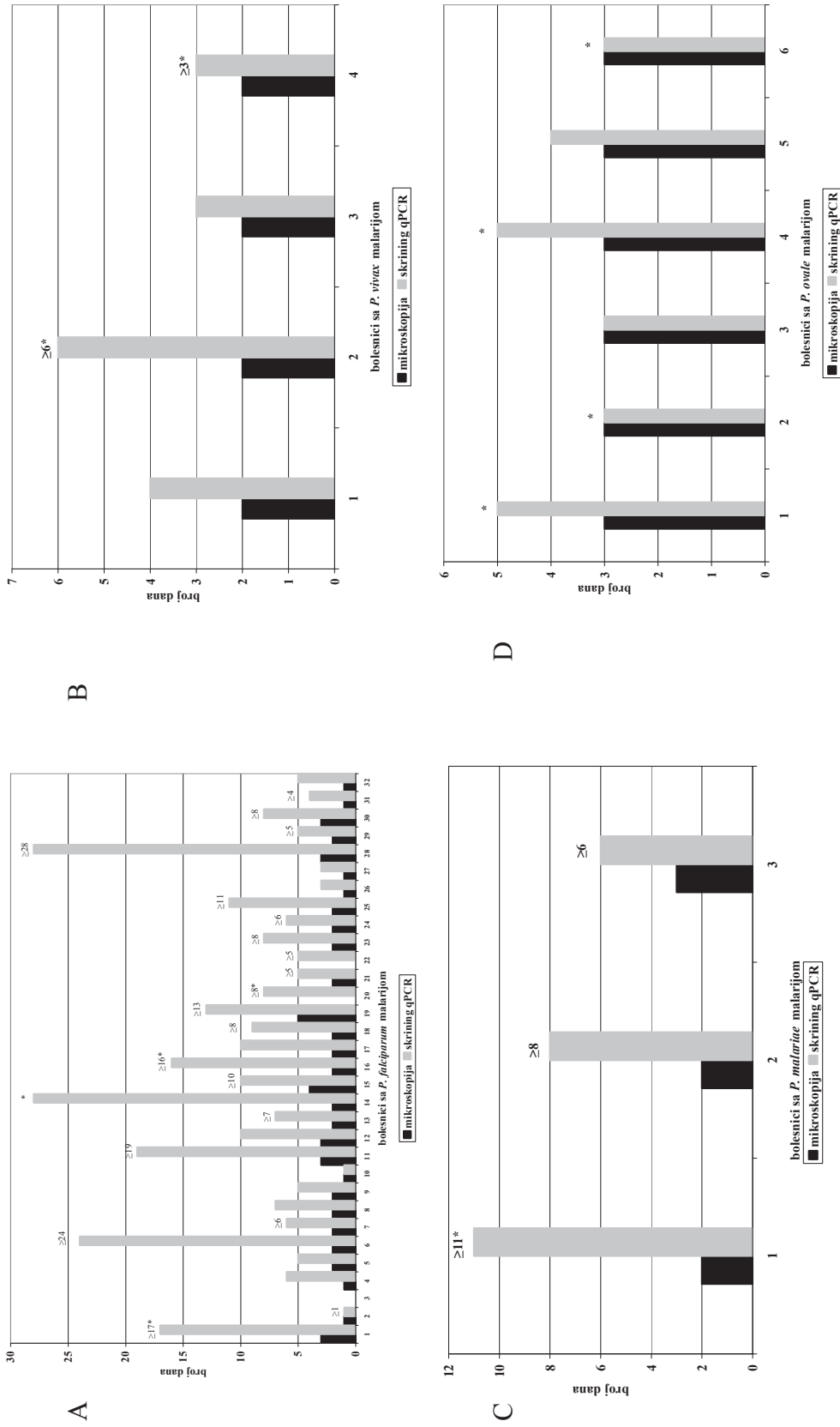
Trajanje parazitemije i DNK-nemije kod 45 bolesnika sa dijagnostikovanom malarijom prikazano je pojedinačno po bolesniku na grafikonu 4.



Oznake u grafikonu: \*prisutni gametociti;  $\geq$  nisu ispitivani narednih dana, do tog dana pozitivni; bolesnici br. 3, 30 i 33: SMM; bolesnik br. 3 negativan i na skrining qPCR-u

**Grafikon 4.** Uporedno trajanje parazitemije i DNK-nemije izraženo u danima za 45 bolesnika sa malarijom pojedinačno po bolesniku

Na grafikonu 5 (A - D) uporedo je prikazano trajanje parazitemije i DNK-nemije pojedinačno po bolesnicima inficiranim pojedinim vrstama plazmodijuma. Na grafikonu 5A prikazano je uporedno trajanje parazitemije i DNK-nemije za 32 bolesnika sa *P. falciparum* malarijom. Među njima su i tri bolesnika sa SMM, od kojih kod jednog nije detektovana parazitska DNK dok se kod druga dva bolesnika DNK-nemija održavala 8 odnosno 5 dana. Maksimalno trajanje DNK-nemije od 28 dana zabeleženo je kod dva bolesnika, od kojih je jedan imao i gametocite. Parazitemija je kod sva četiri bolesnika sa *P. vivax* malarijom trajala 2 dana, dok je DNK-nemija trajala duže (3 - 6 dana). Kod šest bolesnika sa *P. ovale* malarijom parazitemija je trajala 3 dana, a DNK-nemija isto ili duže (raspon 3 - 5 dana). DNK-nemija kod tri bolesnika sa *P. malariae* infekcijom može biti i duža jer je DNK kod sva tri bolesnika detektovana i u poslednjem raspoloživom uzorku.



**Grafikon 5.** Uporedno trajanje parazitemije i DNK-nemije za vrste *Plasmodium* spp: (A) *P. falciparum* (n=32); (B) *P. vivax* (n=4); (C) *P. ovale* (n=6); (D) *P. malariae* (n=3)

Oznake u grafikonu: \*prisutni gametociti;  $\geq$  nisu ispitivani narednih dana, do tog dana pozitivni; (A) bolesnici br. 3, 20 i 22: SMM; bolesnik br. 3 negativan i na skringing qPCR-u

**Tabela 31.** C<sub>T</sub> vrednosti na skrining qPCR-u po danima za 45 bolesnika sa potvrđenom malarijom

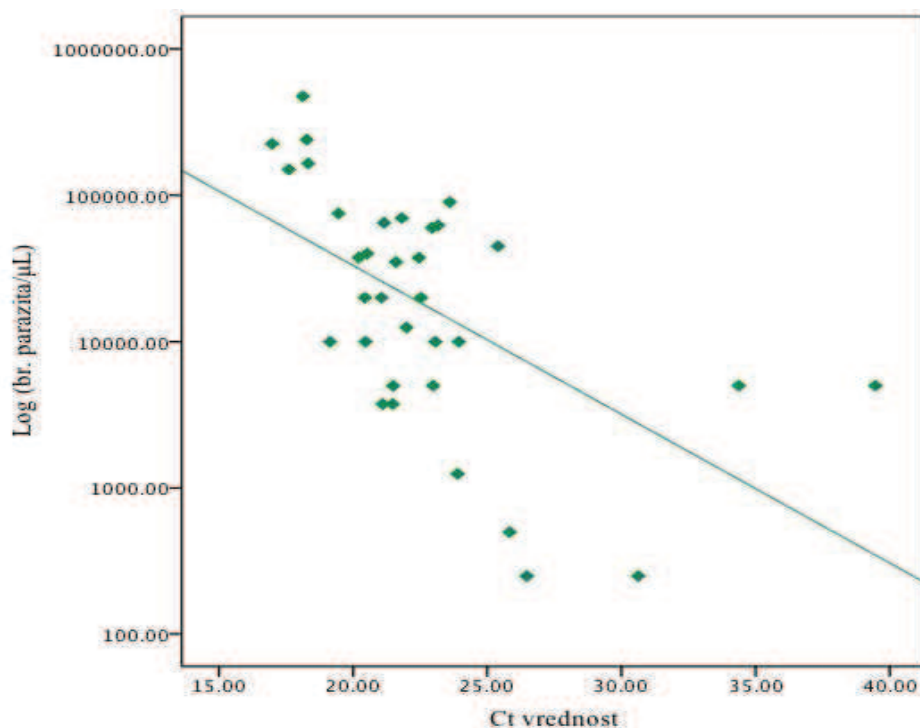
Broj	dani	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	16	17	19	23	24	28	
	spp.	C <sub>T</sub>	C <sub>T</sub>	C <sub>T</sub>	C <sub>T</sub>	C <sub>T</sub>	C <sub>T</sub>	C <sub>T</sub>	C <sub>T</sub>	C <sub>T</sub>	C <sub>T</sub>	C <sub>T</sub>	C <sub>T</sub>	C <sub>T</sub>	C <sub>T</sub>	C <sub>T</sub>	C <sub>T</sub>	C <sub>T</sub>	C <sub>T</sub>	C <sub>T</sub>	C <sub>T</sub>	
1	Pf	21,81	21,15	26,61	33,31			34,50			35,14						36,21					
2	Pf	30,37																				
3	Pf	neg																				
4	Pf	28,54	37,85	39,82			39,62															
5	Pf	25,00	28,16	31,94	36,08	38,57				neg												
6	Pf	18,27	24,48	28,86	31,01		30,88		33,84		36,05					38,10					36,57	
7	Pv				36,84																	
8	Pf	30,63		19,98			35,75															
9	Po	24,71	28,56	32,29		38,01			neg		neg				neg				neg			
10	Pf	21,06	20,46	28,44	32,51	37,36	37,38	36,52			neg											
11	Pf	22,98	23,89	33,02	36,73	36,17		neg			neg					neg						
12	Pf	19,13	**																			
13	Pf	16,97	17,60	23,09	28,08	28,95	30,49	31,82	31,82	29,70											33,72	
14*	Pv	21,97	20,44				38,13															
15*	Pf	23,14	20,43	30,16	30,50	30,70		33,42	34,88		38,51				neg		neg					
16	Pf	19,44	24,49	29,12	30,04	30,26		30,13														
17	Pf	18,12	20,52	22,89	22,30	21,10	22,38	23,69		32,11			28,94		30,69	34,31		35,68				37,86
18	Pm	21,37	22,69			28,46		31,26				36,24										
19	Pf	21,10	21,47	28,31	32,19	32,43			33,65		36,02											
20	Pf	18,32	21,99	27,28	29,95	30,45										35,26						
21	Pm	25,37	30,90	36,46					38,86													
22	Pf	23,94	34,37	35,35		36,18		37,59			39,60											
23	Pf	23,17	20,21	32,43			34,67			35,57												
24	Po	25,74	25,90	27,27			neg		neg													
25	Po	23,75	26,26	35,26		neg		neg								neg						
26*	Pf	21,60	19,45	21,49	28,23	30,64	32,03		35,38					36,26								
27	Po	21,80	22,99	26,80	30,67	33,63		neg														
28	Pm	30,43	27,83	30,22			37,77									neg						
29	Po	28,83	30,51	32,40	39,00				neg													
30	Pf	35,79		36,39			36,11		37,98													
31	Pf	22,53	26,15	30,76	33,76	33,77																
32	Po	28,94		35,08		neg																
33	Pf	38,12	39,23			39,70									neg							
34	Pf	22,94	25,40	32,64		36,25			38,47													
35*	Pf	39,47	25,83		29,60		32,96															
36	Pf	22,45	26,47		36,23	37,95						38,76										
37	Pf	36,84	28,01	38,64	neg																	
38	Pf	30,75	34,23	37,84			neg															
39	Pf	23,60	25,63	30,51	34,81	36,03		37,45														37,08
40	Pf	23,06	25,05	32,15	35,87	37,16																
41	Pv	29,92	29,73	38,00			neg				neg											
42	Pf	24,60	26,64	28,56	32,35	30,40			34,18													
43	Pf	36,19	39,65		30,98																	
44	Pf	28,00	38,64			39,47																
45	Pv	20,68	27,89	32,37																		

Skraćenice u tabeli: spp. (species): vrsta *Plasmodiuma*-a; Pf - *P. falciparum*; Pv - *P. vivax*; Po - *P. ovale*; Pm - *P. malariae*; \*bolesnici kod kojih je zabeležen skok DNK-nemije 2. dana ispitivanja; \*\*usledio smrtni ishod

U tabeli 31 prikazane su  $C_T$  vrednosti na skrining qPCR-u po danima za 45 bolesnika sa potvrđenom malarijom. Kod četiri bolesnika (tri sa *P. falciparum* malarijom i jedan sa *P. vivax*) zabeležen je skok DNK-nemije drugog dana.

#### 4.4.1. KVANTIFIKACIJA PARAZITEMIJE I KORELACIJA PARAZITEMIJE MERENE MIKROSKOPIJOM I SKRINING qPCR-om

Rezultati  $C_T$  vrednosti uzoraka *P. falciparum* (sa numerički definisanim mikroskopskim nalazom) pozitivnih na skrining qPCR-u, poređeni su sa nivoom parazitemije koja je dobijena mikroskopijom. Između ove dve metode pokazana je niska korelacija (Pirsonov koeficijent korelacije  $r=-0,442$ ,  $p=0,009$ ,  $r^2=0,195$ ) (Grafikon 6).

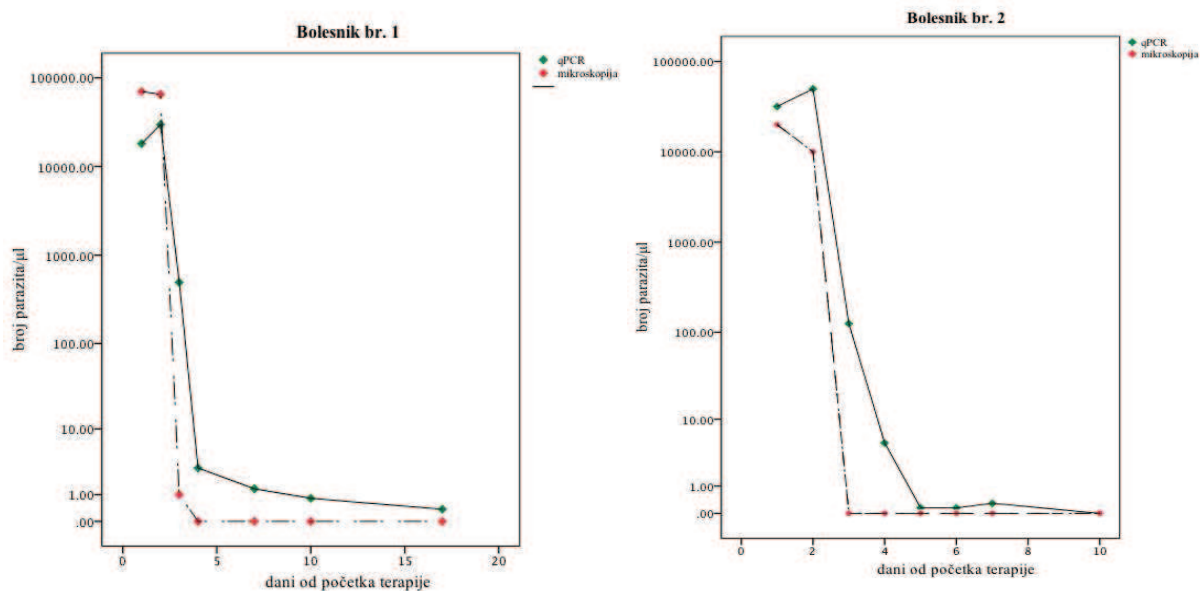


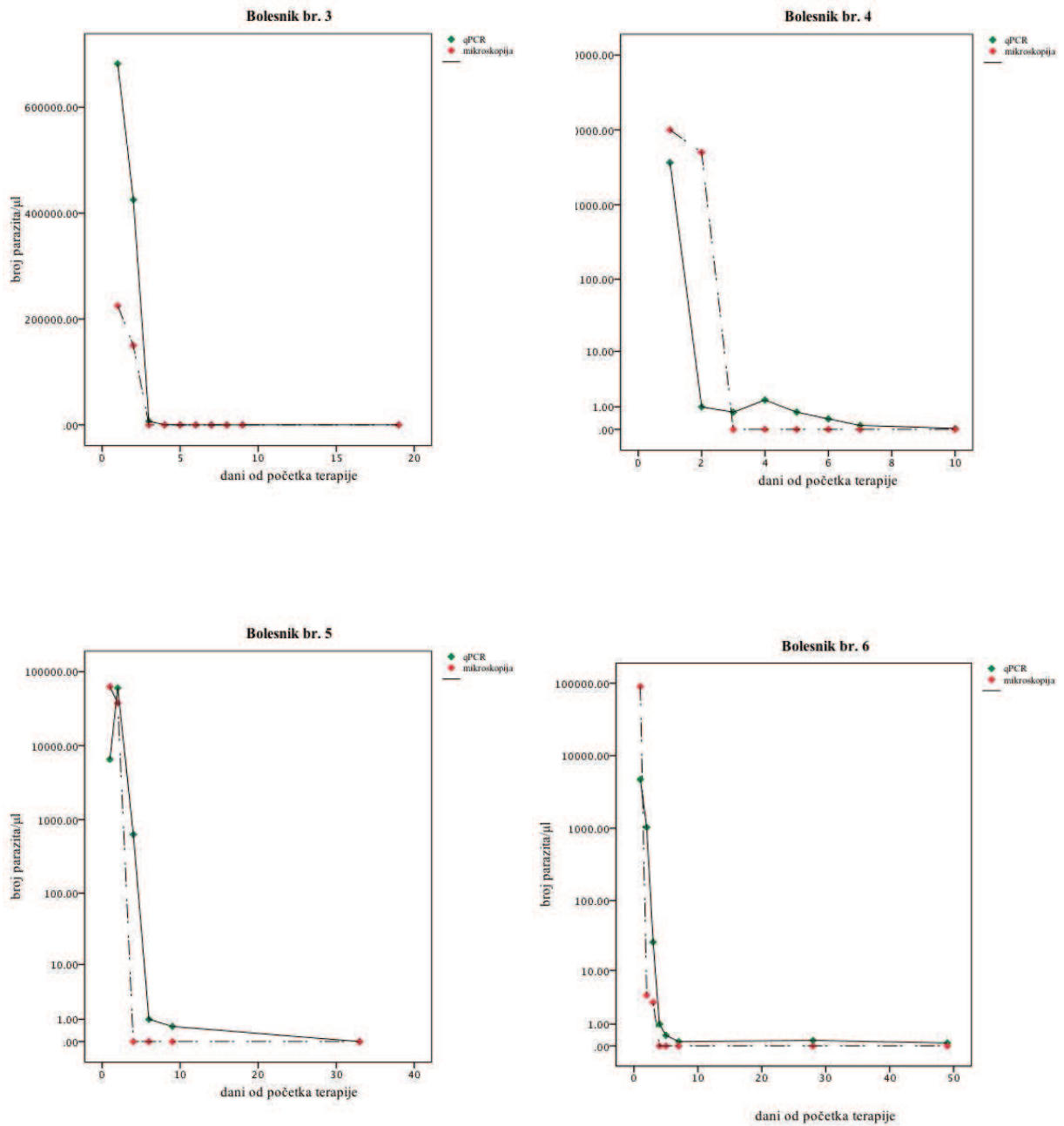
**Grafikon 6.** Korelacija između nivoa parazitemije mikroskopijom izražene brojem par/μL i  $C_T$  vrednosti dobijene skrining qPCR-om

#### 4.4.2. DINAMIKA PARAZITEMIJE *P. falciparum* U TOKU ANTIMALARIČNE TERAPIJE

Terapijski pristup je zavisio od vrste, porekla i stadijuma *Plasmodium* spp., nivoa parazitemije, kao i uzrasta bolesnika i kliničkog toka malarije. Većina bolesnika sa *P. falciparum* malarijom lečena je artemizininskim preparatima, dok je za lečenje komplikovane *P. falciparum* malarije ordinirana intravenska primena kinina. Standardan tretman *P. vivax* malarije uključivao je hlorokvin, praćen terminalnom terapijom primakvinom.

Kod šest bolesnika mikroskopska parazitemija je registrovana duže od 2 dana i definisana je numerički. Otuda je kod tih bolesnika, tj. na njihovim uzastopnim uzorcima (n=46), bila moguća analiza parazitemije u toku i nakon antimalarične terapije (Grafikon 7). Primenjena antimalarična terapija, nivo i trajanje parazitemije mikroskopski i skrining qPCR-om prikazani su u tabeli 32. I mikroskopski i skrining qPCR-om je zapaženo naglo opadanje parazitemije po započinjanju tretmana. Iako je parazitska DNK detektovana duže od mikroskopske parazitemije, uočljiv je sličan pad obe krive. Srednja  $C_T$  vrednost za šest bolesnika dobijena prvog dana mikroskopski nedetektabilne parazitemije bila je  $32,07 \pm 1,28$ , a kretala se u rasponu od 28,08 do 35,35.





**Grafikon 7.** Nivo parazitemije (broj par/ $\mu$ L) određen mikroskopijom i qPCR-om kod bolesnika sa *P. falciparum* infekcijom u toku i nakon antimalarične terapije pojedinačno po bolesniku (ilustrativni primeri)



**Tabela 32.** Nivo i trajanje parazitemije u odnosu na primenjenu terapiju kod bolesnika sa *P. falciparum* malarijom (ilustrativni primeri)

<i>bolesnik</i>	<i>terapija</i>	<i>parazitemija (br. par/<math>\mu</math>L) mikroskopija (dan 0)</i>	<i>parazitemija (br. par/<math>\mu</math>L) qPCR (dan 0)</i>	<i>dužina mikroskopske parazitemije (u danima)</i>	<i>dužina parazitemije skrining qPCR- om (u danima)</i>
1	artemetar, meflokin i doksiciklin	70.000	18.085	3	16*
2	meflokin	20.000	31.741	2	6
3	artemetar, meflokin i doksiciklin	225.000	682.144	2	18*
4	Coartem® i doksiciklin	10.000	3.660	2	9*
5	artemetar, meflokin i doksiciklin	62.500	6.521	2	8
6	artemetar, Coartem® i doksiciklin	90.000	4.723	3	27

Skraćenice u tabeli: \* skrining qPCR bio pozitivan i u poslednjem raspoloživom uzorku

#### 4.5. KLINIČKO-EPIDEMIOLOŠKE KARAKTERISTIKE BOLESNIKA SA MALARIJOM

U narednom delu prikazana je analiza epidemioloških i kliničkih karakteristika bolesnika sa malarijom (n=45) u odnosu na one kod kojih je malarija isključena (n=64) koji su u ovoj analizi poslužili kao kontrolna grupa.

##### 4.5.1. DEMOGRAFSKE I EPIDEMIOLOŠKE KARAKTERISTIKE BOLESNIKA SA MALARIJOM

U grupi bolesnika sa malarijom muški pol je bio apsolutno dominantan (n=43, 95,6%), i značajno više zastupljen nego u kontrolnoj grupi ( $P=0,011$ ). Srednja životna dob je kod malaričnih bolesnika iznosila  $50,0 \pm 11,8$  (23 - 70) godina, a u kontrolnoj grupi  $44,9 \pm 16,0$  (4 - 80), što se međusobno nije statistički razlikovalo ( $P=0,069$ ). Većinu bolesnika u obe grupe činili su državljani Srbije bez značajne razlike između grupa ( $P=0,287$ ) i to radno sposobno stanovništvo (> 20 godina starosti) (n=45, 100% prema n=63, 98,4%) gde takođe nije nađena značajna razlika između grupa ( $P=0,587$ ). Međutim, iako su i bolesnici (n=21, 46,7%) i ispitanici u kontrolnoj grupi (n=17,

26,6%) bili najčešće starosti od 50 do 59 godina, ova starosna grupa bila je značajno zastupljenija kod malaričara ( $P=0,030$ ). Iako je u obe grupe posao bio glavni razlog putovanja ( $n=43$ , 95,6% prema  $n=48$ , 75,0%), u grupi malaričnih bolesnika ovo je bio značajno učestaliji razlog boravka u malaričnom području nego u kontrolnoj grupi ( $P=0,003$ ). Većinom se radilo o građevinskim radnicima na poslovima izgradnje puteva i stambenih objekata u afričkim zemljama ( $n=36$ , 80,0% prema  $n=35$ , 54,7%) što je u kategoriji malaričnih bolesnika bio zastupljeniji razlog poslovnog boravka u endemskim područjima ( $P=0,006$ ). Najveći broj ispitanika u obe grupe boravio je duže od 6 meseci u endemskim područjima za malariju ( $n=37$ , 82,2% prema  $n=40$ , 62,5%) ali je duži boravak značajno učestaliji bio među malaričnim bolesnicima ( $P=0,026$ ) (Tabela 33); među njima je skoro polovina ( $n=19$ , 42,2%) boravila u endemskim područjima čak duže od 2 godine.

Nije bilo razlike između grupa u pogledu korišćenja antimalarične profilakse ( $P=0,565$ ); nijedan bolesnik nije redovno koristio antimalaričnu profilaksu, a u kontrolnoj grupi su je redovno koristila svega dva (3,1%) ispitanika. Grupa bolesnika sa malarijom se razlikovala od kontrolne grupe po učestalosti ranijih epizoda malarije; među bolesnicima, ranije epizode malarije imalo je 86,7%, a u kontrolnoj grupi 51,6% ispitanika ( $P<0,001$ ) (Tabela 33).

Afrika je bila najposećeniji kontinent u obe grupe ispitanika ( $n=43$ , 95,6% prema  $n=56$ , 87,5%,  $P=0,135$ ), i to posebno zemlje centralne Afrike, ali je u grupi malaričnih bolesnika ovo bila značajno učestalija destinacija ( $P=0,026$ ) (Tabela 33). Podatak da je centralna Afrika najposećeniji region odgovara činjenici da je u obe grupe putnika E. Gvineja, centralno afrička zemlja, bila najposećenija zemlja ( $n=21$ , 46,7% prema  $n=17$ , 26,6%) ali u kojoj su značajno češće boravili oboleli od malarije nego ispitanici iz kontrolne grupe ( $P=0,030$ ).

**Tabela 33.** Demografske i epidemiološke karakteristike 45 bolesnika sa malarijom u odnosu na 64 ispitanika kod kojih je malarija isključena (kontrolna grupa)

	<i>bolesnici sa malarijom</i> (n=45)	<i>kontrolna grupa</i> (n=64)	<i>P</i>
<i>karakteristike</i>	<i>br (%)</i>	<i>br (%)</i>	
<b>muškarci</b>	43 (95,6)	50 (78,1)	0,011
<b>srednja životna dob ± SD u god (raspon)</b>	50,0 ± 11,8 (23 - 70)	44,9 ± 16,0 (4 - 80)	0,069
<b>starosna dobna grupa (u god)</b>			
< 10	0 (0)	1 (1,6)	0,587
10 - 19	0 (0)	0 (0)	
20 - 29	3 (6,7)	11 (17,2)	0,030
30 - 39	6 (13,3)	16 (25,0)	
40 - 49	8 (17,8)	8 (12,5)	
50 - 59	21 (46,7)	17 (26,6)	
> 60	7 (15,6)	11 (17,2)	
<b>zemlja porekla ispitanika</b>			
Srbija	40 (88,9)	60 (93,8)	0,287
<i>region unutar Srbije</i>			
<i>Beograd</i>	22 (48,9)	47 (73,4)	
<i>ostali deo Centralne Srbije</i>	14 (31,1)	11 (17,2)	
<i>Vojvodina</i>	4 (8,9)	2 (3,1)	
druge zemlje*	5 (11,1)	4 (6,2)	
<b>razlog putovanja u malarično područje</b>			
posao	43 (95,6)	48 (75,0)	0,003
ostalo	2 (4,4)	16 (25,0)	
<b>zanimanje</b>			
osoblje avio kompanija	2 (4,4)	4 (6,2)	0,006
građevinska zanimanja	36 (80,0)	35 (54,7)	
ostalo	7 (15,6)	25 (39,1)	
<b>dužina boravka</b>			
< 3 ned	1 (2,2)	7 (10,9)	0,026
3 ned - 6 mes	7 (15,6)	15 (23,5)	
> 6 mes	37 (82,2)	40 (62,5)	
živi tamo	0 (0)	2 (3,1)	
<b>antimalarična profilaksa</b>			
da, redovno	0 (0)	2 (3,1)	0,565
da, neredovno	2 (4,4)	1 (1,6)	
alternativna profilaksa	1 (2,2)	2 (3,1)	
ne	42 (93,4)	59 (92,2)	
<b>prethodne epizode malarije</b>			
da	39 (86,7)	33 (51,6)	<0,001

<i>karakteristike</i>	<i>bolesnici sa malarijom</i>	<i>kontrolna grupa</i>	<i>P</i>
	<i>(n=45)</i>	<i>(n=64)</i>	
	<i>br (%)</i>	<i>br (%)</i>	
<b>MESTO PUTOVANJA</b>			
<b>kontinent</b>			
Afrika	43 (95,6)	56 (87,5)	0,135
Azija	2 (4,4)	6 (9,3)	
Evropa	0 (0)	1 (1,6)	
J. Amerika	0 (0)	1 (1,6)	
<b>region</b>			
centralna Afrika	29 (64,5)	28 (43,7)	0,026
istočna Afrika	2 (4,4)	9 (14,0)	
zapadna Afrika	12 (26,7)	18 (28,1)	
istočna i zapadna Afrika	0 (0)	1 (1,6)	
južna Azija	1 (2,2)	2 (3,1)	
jugoistočna Azija	0 (0)	3 (4,7)	
južna i jugoistočna Azija	1 (2,2)	1 (1,6)	
Južna Amerika	0 (0)	1 (1,6)	
Evropa	0 (0)	1 (1,6)	

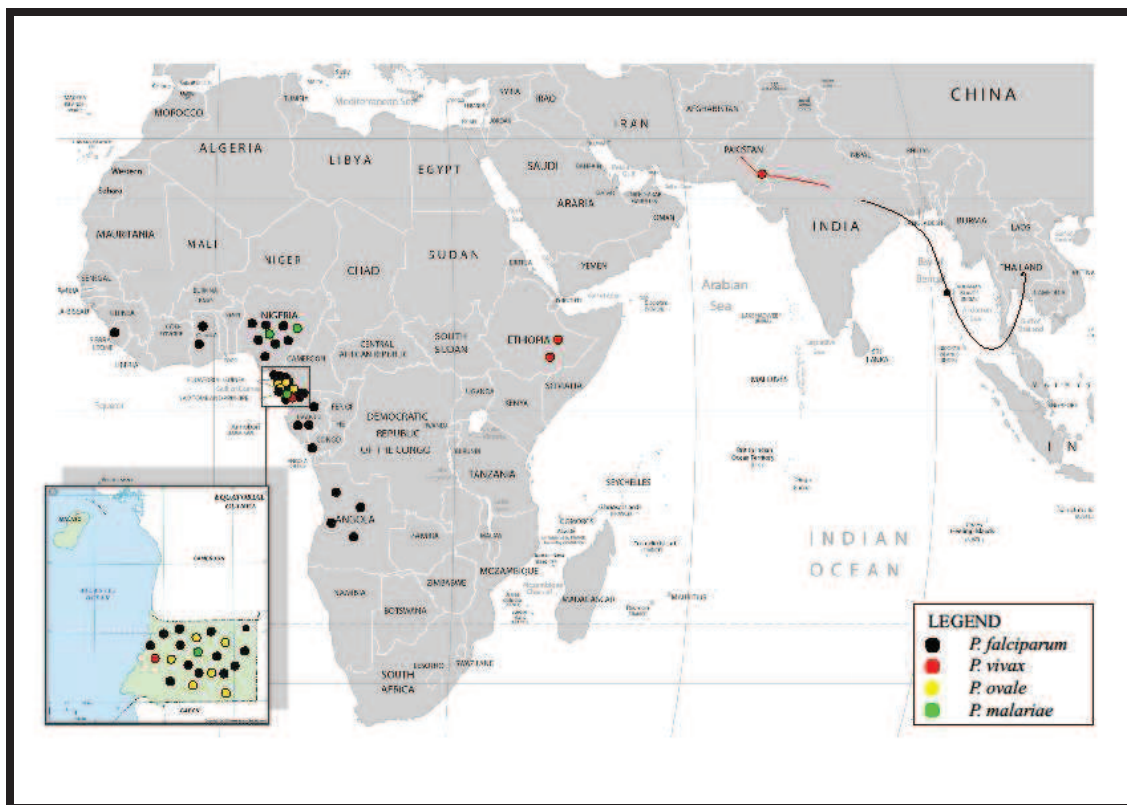
Skraćenice u tabeli: SD - standardna devijacija; \*Crna Gora, Republika Srpska (BiH), Engleska, Italija, Kina, SAD, Uganda

Iz E. Gvineje importovane su sve četiri vrste plazmodijuma, najviše *P. falciparum* (n=13), svih šest infekcija *P. ovale* kao i po jedna infekcija *P. vivax* i *P. malariae* (Tabela 34, Slika 4).

**Tabela 34.** Geografsko poreklo 45 importovanih *Plasmodium* spp. infekcija

<i>kontinent</i>	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. malariae</i>	$\Sigma$
Afrika	31	3	6	3	43 (95,6%)
Azija	1	1	0	0	2 (4,4%)
<b>posećene zemlje</b>					
Angola	4	0	0	0	4
E. Gvineja	13	1	6	1	21
Etiopija	0	2	0	0	2
Gabon	3	0	0	0	3
Gana	2	0	0	0	2
Kongo	1	0	0	0	1
Nigerija	7	0	0	2	9
Sijera Leone	1	0	0	0	1
više azijskih	1*	1**	0	0	2
$\Sigma$	<b>32</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>45</b>

Skraćenice u tabeli: \*Indija + Tajland; \*\*Indija + Pakistan



Slika 4. Geografsko poreklo 45 importovanih vrsta roda *Plasmodium*

#### 4.5.2. KLINIČKO-LABORATORIJSKE KARAKTERISTIKE BOLESNIKA SA MALARIJOM

Svih 45 bolesnika sa potvrđenom malarijom je imalo karakterističnu kliničku sliku ove bolesti. Kod tri (6,7%) bolesnika tegobe su započele pre povratka u zemlju, dok su tegobe kod najvećeg broja obolelih započele u toku prve (n=18, 40,0%) i druge nedelje (n=10, 22,2%) po dolasku u zemlju. Međutim, kod osam bolesnika tegobe su započele tek između 2 meseca i godinu dana po povratku (Tabela 35); u svim ovim slučajevima se radilo o bolesnicima sa *ne-falciparum* malarijom. Srednje vreme javljanja tegoba kod bolesnika sa dijagnostikovanom *P. falciparum* infekcijom bilo je  $7,8 \pm 6,9$  (1 - 30) dana, kod *P. vivax*  $61,0 \pm 99,7$  (15 - 210), kod *P. ovale*  $165,0 \pm 113,1$  (72 - 365) a kod *P. malariae*  $42,7 \pm 67,0$  (2 - 120) dana.

U kontrolnoj grupi kod 18 (34,6%) bolesnika tegobe su započele pre povratka u zemlju, kod 10 (19,2%) bolesnika tegobe su počele u toku prve nedelje, a kod pet (9,6%) u toku druge nedelje po dolasku u zemlju. Kod četiri (7,7%) bolesnika tegobe su se javile nakon godinu dana po povratku (Tabela 35). Odsustvo tegoba isključivalo je

malariju ( $P<0,001$ ). Udruženost malarije sa hroničnim bolestima zabeležena je kod 26,7% bolesnika dok su hronične bolesti u kontrolnoj grupi bile zastupljene sa 12,5%, što se međusobno nije statistički razlikovalo ( $P=0,060$ ). Svi bolesnici sa malarijom lečeni su hospitalno, a hospitalizacija je prosečno trajala  $12,0 \pm 11,2$  (1 - 85) dana (Tabela 35).

Interesantno je da su se u obe kategorije tegobe javile kod većine ispitanika u prvih mesec dana po povratku ( $n=37/45$ , 82,2% prema  $n=40/52$ , 76,9%), bez značajne razlike između grupa ( $P=0,522$ ). Za one koji su već došli u zemlju bolesni ispostavilo se da su češće bili oboleli od drugih bolesti nego od malarije ( $P<0,001$ ), dok se malarija najčešće javljala prvih 7 dana po povratku u zemlju ( $P=0,004$ ).

Srednje vreme od pojave tegoba do javljanja na pregled bilo je za obolele od malarije  $4,8 \pm 4,4$  (0 - 20) prema  $5,5 \pm 10,4$  (0 - 60) dana za putnike sa tegobama iz kategorije kod kojih je malarija isključena, što znači da su se malarični bolesnici javljali na pregled značajno ranije ( $P=0,033$ ) (Tabela 35).

Trinaest (28,3%) malaričnih bolesnika je u vreme javljanja na pregled započelo terapiju antimalaricima, i to samoinicijativno ( $n=12$ ) ili u drugoj zdravstvenoj ustanovi ( $n=1$ ) što je bilo značajno češće ( $P=0,004$ ) nego u kategoriji ispitanika kod kojih je malarija isključena, gde je pet (7,8%) bolesnika samoinicijativno započelo terapiju antimalaricima.

Svih 45 (100%) bolesnika sa malarijom bili su febrilni. Jezu i drhtavicu imalo je 42 (93,3%) bolesnika, mijalgije 32 (71,1%), malaksalost 28 (62,2%) a glavobolju 21 (46,7%) bolesnik. Hepatomegalija je evidentirana kod 27 (60,0%) bolesnika i splenomegalija kod 25 (55,6) među kojima je kombinovanu hepatosplenomegaliju imalo 20 (44,4%) bolesnika (Tabela 36).

**Tabela 35.** Anamnestički podaci vezani za malariju za grupu bolesnika sa malarijom u odnosu na ispitanike kod kojih je malarija isključena (kontrolna grupa)

<i>Karakteristike</i>	<i>bolesnici sa malarijom (n=45)</i>	<i>kontrolna grupa (n=64)</i>	<i>P</i>
	<i>br (%)</i>	<i>br (%)</i>	
<b>kriterijumi za dijagnostiku malarije</b>			
epidemiološki nadzor	0 (0,0)	12 (18,7)	<0,001
klinička bolest	45 (100,0)	52 (81,3)	
<b>prethodna terapija antimalaricima</b>	13 (28,3)	5 (7,8)	0,004
<b>hronične bolesti</b>	12 (26,7)	8 (12,5)	0,060
<b>vreme od dolaska u zemlju do pojave tegoba, intervalno</b>	<i>(n=45)</i>	<i>(n=52)</i>	0,522*
došao bolestan	3 (6,7)	18 (34,6)	<0,001
1 - 7 dana	18 (40,0)	10 (19,2)	0,004
8 - 14 dana	10 (22,2)	5 (9,6)	0,087
15 d - 1 mes	6 (13,3)	7 (13,5)	0,612
1 - 2 mes	0 (0)	3 (5,8)	0,150
2 mes - 1 god	8 (17,8)	5 (9,6)	0,240
duže od 1 god	0 (0)	4 (7,7)	0,078
<b>vreme od pojave tegoba do javljanja na pregled u danima</b>	4,8 ± 4,4	5,5 ± 10,4	0,033
<b>[<math>\bar{x} \pm SD</math> (raspon)]</b>	(0 - 20)	(0 - 60)	
<b>hospitalizacija</b>	45 (100,0)	18 (28,1)	<0,001

Skraćenice u tabeli:  $\bar{x}$  - srednja vrednost; SD - standardna devijacija; \* pojava tegoba u prvih mesec dana

Statistička analiza kliničkih manifestacija pokazala je da su u kategoriji bolesnika sa dokazanom malarijom u odnosu na one kod kojih je malarija isključena statistički značajnije zastupljene varijable: febrilnost, jeza/drhtavica, mijalgije, artralgijske, splenomegalija, hepatomegalija, splenohepatomegalija, žutica, tamna mokraća i oskudno mokrenje. Nasuprot tome, učestalost varijabli glavobolja, malaksalost, muka/povraćanje, pad apetita, abdominalni bol, dijareja, gubitak telesne težine, dizurične tegobe, konfuznost, težak poremećaj svesti, kožne promene, limfadenopatija, konjunktivitis, hiperemična guša, dispneja i pneumonija, nije se statistički značajno razlikovala između ove dve grupe ispitanika (Tabela 36).

Bilo je šest teških slučajeva malarije, i svi su bili izazvani *P. falciparum*-om (13,3% od svih slučajeva malarije, odnosno 18,8% slučajeva *P. falciparum* infekcije). Jedan bolesnik razvio je insuficijenciju bubrega i cerebralnu malariju što je za posledicu imalo letalni ishod (2,2% od svih slučajeva malarije, odnosno 3,1% slučajeva *P. falciparum* infekcije). Kod ostalih bolesnika komplikacije su uspešno terapijski razrešene. Dva bolesnika imala su diseminovanu intravaskularnu koagulaciju, a po



jedan renalnu insuficijenciju, cerebralnu malariju i hemolitičku anemiju. Teška malarija nije uvek korelirala sa nivoom parazitemije; tako je npr jedan bolesnik imao parazitemiju od 4,5%, drugi od 2%, dok je kod svih ostalih parazitemija bila ispod 0,7%.

**Tabela 36.** Kliničke karakteristike 45 bolesnika sa potvrđenom malarijom u odnosu na 52 ispitanika sa tegobama iz kontrolne grupe kod kojih je malarija isključena

<i>karakteristike</i>	<i>bolesnici sa malarijom (n=45) br (%)</i>	<i>kontrolna grupa (n=52) br (%)</i>	<i>P</i>
<b>KLINIČKA SLIKA</b>			
febrilnost	45 (100,0)	38 (73,1)	<0,001
jeza/drhtavica	42 (93,3)	12 (23,1)	<0,001
glavobolja	21 (46,7)	19 (36,5)	0,312
malaksalost	28 (62,2)	26 (50,0)	0,226
mijalgije	32 (71,1)	13 (25,0)	<0,001
artralgije	25 (55,6)	15 (28,8)	0,007
muka/povraćanje	13 (28,9)	9 (17,3)	0,174
pad apetita	5 (11,1)	5 (9,6)	0,534
abdominalni bol	8 (17,8)	7 (13,5)	0,560
dijareja	10 (22,2)	10 (19,2)	0,718
gubitak telesne težine	1 (2,2)	2 (3,8)	0,554
splenomegalija	25 (55,6)	1 (1,9)	<0,001
hepatomegalija	27 (60,0)	6 (11,5)	<0,001
splenohepatomegalija	20 (44,4)	1 (1,9)	<0,001
žutica	9 (20,0)	0 (0)	<0,001
dizurične tegobe	4 (8,9)	5 (9,6)	0,592
tamna mokraća	16 (35,6)	2 (3,8)	<0,001
oskudno mokrenje	6 (13,3)	0 (0)	0,008
konfuznost	3 (6,7)	0 (0)	0,096
težak poremećaj svesti	2 (4,4)	0 (0)	0,213
kožne promene	7 (15,6)	4 (7,7)	0,224
limfadenopatija	2 (4,4)	3 (5,8)	0,569
konjunktivitis	1 (2,2)	1 (1,9)	0,715
hiperemična guša	7 (15,6)	14 (26,9)	0,175
dispneja	17 (37,8)	16 (30,8)	0,467
pneumonija	6 (13,3)	5 (9,6)	0,566

Skraćenice u tabeli:  $P < 0,05$  statistički značajno

U hematološkim nalazima kod 28 (62,2%) bolesnika zabeležen je pad Er, kod 16 (35,6%) pad Hgb, dok je kod apsolutne većine (n=40, 88,9%) zabeležena trombocitopenija. Porast LDH imalo je 35 (77,8%) bolesnika. Kod malaričnih bolesnika su se značajno ( $P < 0,05$ ) češće zapažali hemoglobinemija, eritrocitopenija, leukopenija i



porast LDH, dok je trombocitopenija bila najkarakterističniji hematološki marker ( $P < 0,001$ ) (Tabela 37).

**Tabela 37.** Osnovne laboratorijske karakteristike 45 bolesnika sa malarijom u odnosu na ispitanike sa tegobama ( $n=49$ ) iz kontrolne grupe kod kojih je malarija isključena

	<i>bolesnici sa malarijom</i> ( $n=45$ )	<i>kontrolna grupa</i> ( $n=49$ )*	
<i>hematološke analize</i>	$\bar{x} \pm SD$ (raspon)	$\bar{x} \pm SD$ (raspon)	<i>P</i>
Hgb	133,8 $\pm$ 23,6 (79 - 180)	141,5 $\pm$ 18,3 (84 - 189)	0,079
Er	4,3 $\pm$ 0,7 (2,6 - 5,7 x 10 <sup>12</sup> )	4,6 $\pm$ 0,6 (2,9 - 6,3)	0,082
Le	6,0 $\pm$ 4,0 (2,5 - 18,9 x 10 <sup>9</sup> )	8,5 $\pm$ 4,6 (2,4 - 21,4)	0,005
Tr	86,0 $\pm$ 46,7 (11 - 194 x 10 <sup>9</sup> )	223,9 $\pm$ 77,7 (91 - 520)	<0,001
LDH	749,4 $\pm$ 439,7 (351 - 2877)	484,4 $\pm$ 262,1 (289 - 1373)	0,020
	<b>br (%)</b>	<b>br (%)</b>	<b>P</b>
hemoglobinemija	16 (35,6)	7/49 (14,3)	0,017
eritrocitopenija	28 (62,2)	20/49 (40,8)	0,038
leukopenija	16 (35,6)	6/49 (12,2)	0,007
trombocitopenija	40 (88,9)	7/48 (14,6)	<0,001
↑LDH	35 (77,8)	9/18 (50)	0,030

Skraćenice u tabeli: \*Nisu dostupni podaci za svih 52 bolesnika sa tegobama kod kojih je isključena malarija;  $\bar{x}$  - srednja vrednost; SD - standardna devijacija; Hgb - hemoglobin; Er - eritrociti; Le - leukociti; Tr - trombociti; Referentne vrednosti: Hgb: < 120 za žene, 130 g/L za muškarce; Er: < 4,2 za žene, 4,5 x 10<sup>12</sup>/L za muškarce, Le: < 4x10<sup>9</sup>/L; Tr: < 150x10<sup>9</sup>/L; LDH: >460 U/L

#### 4.5.3. RELAPSI I REKRUEDESCENCIJE MALARIJE

Od 45 bolesnika sa dijagnostikovanom malarijom kod 38 bolesnika radilo se o inicijalnoj infekciji. U tri slučaja zabeležen je relaps a kod četiri bolesnika radilo se o rekrudescenciji vrste *P. falciparum*. Relapsi su zabeleženi nakon 10, 45 i 128 dana. Dva relapsa zabeležena su kod istog bolesnika koji se nakon dvogodišnjeg boravka u E. Gvineji vratio u Srbiju. Deset dana nakon povratka zbog febrilnosti bolesnik je samoinicijativno uzeo fiksnu kombinaciju antimalarika (artesunat + meflokin) i tegobe su se povukle. Ponovno javljanje febrilnosti usledilo je već nakon 3 dana od završene terapije a kod nas se javio nakon 8 dana kada je dijagnostikovao i lečen *P. malariae* (retrospektivno specijes-specifičnim qPCR-om potvrđen *P. ovale*). Nakon 4 meseca od prethodne epizode malarije (bolesnik nije u međuvremenu putovao van Srbije) usledio je drugi relaps. Mikroskopski je viđen *P. malariae* ali je molekularna dijagnostika potvrdila da se radi o *P. ovale*. Treći relaps zabeležen je kod bolesnika koji se nakon povratka iz E. Gvineje dva puta pri epizodama febrilnosti samoinicijativno lečio

artesanatom. Kod treće epizode malarije došao je na pregled kada je dijagnostikovao *P. ovale*.

Rekrudescencije su se javile nakon 15, 3, 10, odnosno 20 dana od lečenja inicijalne *falciparum* malarije. Prvi bolesnik se nakon povratka iz E. Gvineje sam lečio artesanatom pri pojavi febrilnosti, da bi nakon 15 dana došlo do nove epizode febrilnosti kada se javlja na pregled i tada je dijagnostikovao *P. falciparum*. Drugi bolesnik se u fazi oporavka od *falciparum* malarije vratio iz E. Gvineje u Srbiju, da bi do ponovne epizode malarije došlo nakon 3 dana od dolaska u zemlju. Slična situacija zabeležena je i kod bolesnika kod koga je rekrudescencija lečene *falciparum* infekcije usledila nakon 10 dana po povratku iz E. Gvineje u Srbiju. Četvrti bolesnik postaje febrilan 20 dana nakon povratka iz Gabona, kada se samoinicijativno leči Coartem®-om. Do rekrudescencije dolazi nakon 20-ak dana, kada se javlja u našu laboratoriju gde je dijagnostikovana *falciparum* malarija.

#### 4. 6. DISTRIBUCIJA GAMETONOŠTVA U PROCENI RIZIKA ZA PONOVRNO USPOSTAVLJANJE MALARIJE

Među 45 bolesnika sa malarijom otkriveno je 11 (24,4%) nosilaca gametocita, kod većine (n=9, 81,8%) u umerenom broju (Tabela 38). Mikroskopski vidljivo gametonoštvo je trajalo  $4,2 \pm 3,6$  (2 - 14) dana. Svi gametociti *P. ovale* (n=4), tri *P. falciparum* i jedan *P. malariae* poticali su iz E. Gvineje. Jedan *P. falciparum* gametonoša infekciju je stekao u Nigeriji, dok su nosioci *P. vivax* gametocita inficirani u Etiopiji odnosno Indiji/Pakistanu.

Nije bilo nosilaca gametocita među 64 ispitanika kod kojih je isključena malarija.

**Tabela 38.** Gametonoštvo kod 11 od 45 bolesnika sa malarijom

	<i>br</i>	%
<b>prisutni gametociti</b>	11	24,4
<b>gustina gametocita</b>		
retki	1	9,1
umereno prisutni	9	81,8
brojni	1	9,1

Među bolesnicima sa *P. falciparum* infekcijom gametociti su nađeni kod 12,5%, kod *P. vivax* infekcije 50%, *P. ovale* 66,7% i *P. malariae* 33,3%. Srednje trajanje gametonoštva kod *P. malariae* bilo je 7 dana, a kod *P. falciparum*  $6 \pm 5,5$  (2 - 14) dana. Tokom letnjih meseci, od juna do septembra, pet bolesnika imalo je gametocite, četiri *P. falciparum* i jedan *P. malariae* (Tabela 39).

**Tabela 39.** Zastupljenost gametonoštva kod 11 bolesnika sa malarijom po vrstama plazmodijuma

<i>Plasmodium</i> spp.	br gametonoša	%	srednje trajanje gametonoštva u danima $\bar{x} \pm SD$ (raspon)	javljanje leti
<i>P. falciparum</i>	4/32	12,5	$6 \pm 5,5$ (2 - 14)	4
<i>P. vivax</i>	2/4	50,0	$2,5 \pm 0,7$ (2 - 3)	0
<i>P. ovale</i>	4/6	66,7	$2,5 \pm 0,6$ (2 - 3)	0
<i>P. malariae</i>	1/3	33,3	7	1
$\Sigma$	<b>11/45</b>	24,4	$4,2 \pm 3,6$ (2 - 14)	5

DNK-nemija je kod 11 bolesnika sa gametocitima trajala  $9,6 \pm 7,9$  (3 - 28) dana, dok je DNK-nemija kod 34 bolesnika bez mikroskopski uočenih gametocita bila  $7,4 \pm 6,0$  (0 - 28) dana. Razlika u trajanju DNK-nemije u ovim kategorijama nije bila statistički značajna ( $P=0,323$ ). Analizirano po vrstama plazmodijuma, samo je kod *P. falciparum* pokazana statistički značajna razlika ( $P=0,011$ ) u trajanju DNK-nemije između nosilaca gametocita [ $17,5 \pm 7,9$  (9 - 28)] i bolesnika bez gametocita [ $8,0 \pm 6,4$  (0 - 28)] (Tabela 40).

**Tabela 40.** Trajanje DNK-nemije (u danima) u odnosu na gametonoštvo

<i>Plasmodium</i> spp.	br gametonoša	srednje trajanje DNK-nemije u danima kod gametonoša $\bar{x} \pm SD$ (raspon)	srednje trajanje DNK-nemije u danima kod negametonoša $\bar{x} \pm SD$ (raspon)	P
<i>P. falciparum</i>	4	$17,5 \pm 7,9$ (9 - 28)	$8,0 \pm 6,4$ (0 - 28)	0,011
<i>P. vivax</i>	2	$4,5 \pm 2,1$ (3 - 6)	$3,5 \pm 0,7$ (3 - 4)	0,592
<i>P. ovale</i>	4	$4 \pm 1,2$ (3 - 5)	$3,5 \pm 0,7$ (3 - 4)	0,615
<i>P. malariae</i>	1	11	$7 \pm 1,4$ (6 - 8)	*
$\Sigma$	11	$9,6 \pm 7,9$ (3 - 28)	$7,4 \pm 6,0$ (0 - 28)	0,323

\*nedovoljan broj uzoraka za statističku analizu

***DISKUSIJA***

## 5. DISKUSIJA

Prilikom postavljanja dijagnoze malarije neki od problema mikroskopije mogu biti eliminisani upotrebom brzih testova, što se naročito ogleda u brzini dobijanja rezultata i njihovoj uspešnosti u detekciji specifičnog HRP2 antigena najmalignije *P. falciparum* vrste. Međutim, nedostaci brzih testova u vidu slabe osetljivosti kod nefalciparumskih vrsta i niskih parazitemija kao i nepouzdanosti u identifikaciji mešanih infekcija (68) ograničavaju uspešnost čak i simultane primene ove dve metode. Uvođenje molekularne dijagnostike, bazirane na PCR-u, dovelo je do značajnog napretka u dijagnostici malarije.

Brojna komparativna ispitivanja primene dijagnostičkih metoda koje su uključivale i molekularne metode za dijagnostiku malarije ukazale su na porast potvrđenih slučajeva malarije i tačnu dijagnostiku *Plasmodium* vrsta (111, 112). Meta-analiza Berry i sar. (2005) 13 studija u kojima su poređeni mikroskopija i PCR pokazala je da je PCR bio 11% uspešniji u dijagnostici importovane malarije od mikroskopije (113), dok je jednim istraživanjem u Belgiji pokazana veća uspešnost PCR-a za 8,3% (93). Molekularnim metodama je posebno unapređena dijagnostika nefalciparumskih vrsta i otkrivanje mešanih infekcija (23, 73, 96, 113, 114).

Molekularna dijagnostika malarije pre istraživanja prikazanog u ovom radu nije bila uvedena u Srbiji, te ovde prikazani rezultati uporednog ispitivanja dijagnostike malarije molekularnim i konvencionalnim metodama predstavljaju prve podatke o primeni molekularnih tehnika u dijagnostici malarije u našoj zemlji. Međutim, bitno je naglasiti da metodologija molekularne dijagnostike malarije, budući da se još uvek usavršava, nije usaglašena ni među vodećim svetskim laboratorijama. Razlike su velike i brojne i odnose se na sve delove procedure, od prikupljanja i čuvanja uzoraka, postupka ekstrakcije DNK, ciljnih gena, do tehnoloških razlika koje se odnose na aparate za amplifikaciju različitih proizvođača, primenu različitih tehnika za vizuelizaciju registrovanih signala, kao i primenu protokola za izvođenje koji se razlikuju u većem broju detalja (koncentracija prajmera i proba, interne kontrole itd.).

Otuda je u ovom istraživanju prvi korak bio odabir i zatim standardizacija protokola koji će dati što bolje rezultate.

U ovom trenutku se među svim PCR tehnikama, zbog superiorne osjetljivosti, niskog rizika od kontaminacije i malog broja lažno negativnih rezultata, u kliničkoj dijagnostici i referentnim laboratorijama qPCR format pokazuje najuspješnijim u dijagnostici importovane malarije (92, 93, 100, 101, 112, 113, 114, 115, 116, 117). S obzirom na to da je naše istraživanje imalo ambiciju da se uvede metoda koja će moći da zaživi u kliničkoj dijagnostici, opredelili smo se za qPCR zbog mogućnosti dobijanja brzih i pouzdanih rezultata lakih za očitavanje, bez rizika od kontaminacije.

Dosadašnja istraživanja su pokazala najvišu osjetljivost i specifičnost metoda za dokazivanje prisustva DNK poreklom od roda *Plasmodium* u kojima se kao ciljni gen koristi visoko konzervirani region 18S rRNK gena, koji je prisutan kod sve četiri glavne vrste plazmodijuma (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* i *P. malariae*) (97, 100). Pošto se ovaj region 18S rRNK gena nalazi u segmentu od 157 - 165 bp u genomu plazmodijuma svih ovih vrsta, odabran je protokol Rougemont-a i sar. (2004) koji se zasniva upravo na njegovoj detekciji i koji se najčešće i primenjuje (100). Stoprocentna saglasnost nalaza skrining qPCR-a obavljenog u Parazitološkoj laboratoriji Univerzitetske bolnice u Remsu na 10 nasumično izabranih uzoraka sa našim nalazom, pokazala je da su i naš odabir protokola i njegovo izvođenje bili adekvatni.

Specijes-specifični qPCR za identifikaciju *P. falciparum*, *P. vivax* i *P. ovale* izvođen je prema protokolu Perandin-a i sar. (2004), a za *P. malariae* prema protokolu Rougemont-a i sar. (2004) (92, 100). Za petu vrstu, *P. knowlesi*, nije bilo potrebe jer je svega pet putnika boravilo u JI Aziji, od toga četvoro turistički na Tajlandu, te nisu boravili u područjima u kojima je distribuirana ova vrsta. Kod petog putnika, koji je boravio u Indiji i na Tajlandu, dijagnostikovana je malarija, ali je već morfološki bila jasna *P. falciparum* infekcija, što je potvrđeno i brzim testom i specijes-specifičnim qPCR-om.

Poređenjem dobijenih nalaza na specijes-specifičnom qPCR-u sa rezultatima 11 uzoraka ispitivanih konvencionalnim PCR-om u Švedskoj, uočeno je podudaranje

nalaza ove dve molekularne tehnike za identifikaciju vrsta plazmodijuma u osam (72,7%) slučajeva. Među tri diskrepantna uzorka, u sva tri slučaja je specijes-specifični qPCR bio negativan, dok je konvencionalnim PCR-om u dva slučaja dokazan *P. ovale* (koji je uočen i mikroskopski), a u jednom slučaju *P. falciparum*. I dok je odsustvo detekcije *P. ovale*, zbog odabira neadekvatnih prajmera, predstavljalo stvarno lažno negativan nalaz, u slučaju negativnog nalaza *P. falciparum* radilo se o rezidualnoj DNK detektovanoj konvencionalnim ali ne i qPCR-om, što pokazuje nižu osetljivost ovog drugog, ali klinički adekvatnu jer je za kliničke potrebe detekcija rezidualne DNK manjkavost.

Radi pravilnog tumačenja rezultata dobijenih konvencionalnim i molekularnim metodama, njihovog međusobnog poređenja kao i poređenja sa svetskim studijama, neophodno je sagledavanje osnovnih demografskih, epidemioloških, kliničkih i hematološko-biohemijskih specifičnosti ispitanika uključenih u laboratorijsku dijagnostiku malarije.

Analizom svih 109 ispitanika, uočava se dominacija muškog pola (85,3%), većinom državljanina Srbije (91,7%) i to radno sposobnog stanovništva srednje životne dobi od 47 godina, kojima je posao bio glavni razlog putovanja (83,5%). Većinom se radilo o građevinskim radnicima (65,1%) na poslovima izgradnje puteva i stambenih objekata u afričkim zemljama. Shodno razlogu putovanja, većina (70,7%) je boravila duže od 6 meseci u endemskim područjima za malariju. Dug boravak uslovio je da je 66,1% ispitanika imao ranije epizode malarije, od jedne do čak 12 epizoda. Ovaj podatak ukazuje na značajnu kategoriju delimično imunizovanih putnika, što može usloviti nisku parazitemiju i mogućnost SMM (66).

Antimalaričnu profilaksu koristilo je samo pet putnika, od toga svega dva (1,8%) redovno. Afrika je bila najposećeniji kontinent (90,8%), i to najviše centralna i zapadna Afrika. Najveći broj putnika boravio je u E. Gvineji, Nigeriji, Gani i Angoli. I u zemljama zapadne Evrope i Amerike najveći broj slučajeva malarije importuje se iz Afrike, takođe dominira *P. falciparum*, ali je demografski sastav obolelih drugačiji. Uglavnom se radi o imigrantima iz afričkih zemalja koji posećuju svoju rodbinu dok domaće stanovništvo malariju stiče na turističkim putovanjima u endemska područja (66, 118, 119, 120). Srednje vreme od povratka u zemlju do pojave kliničkih tegoba bilo

je 10,6 dana, a od pojave tegoba do javljanja na pregled 5,1 dan. Samoinicijativno započinjanje antimalarične terapije zabeleženo je kod 18,6% ispitanika, što je uslovalo dijagnostičke teškoće konvencionalnim metodama (potreba višekratne mikroskopije, nesigurnost u tumačenju nalaza brzih testova) i dalo primat primeni molekularne detekcije.

U kliničkoj slici dominirala je febrilnost, zabeležena kod 85,6% ispitanika. S obzirom na to da klinička slika malarije nije uvek tipična, dijagnostikom je obuhvaćeno i 14 afebrilnih bolesnika sa drugim tegobama koje su obavezivale na isključenje malarije. Hepatomegalija je evidentirana kod 34,0% bolesnika, a 21,6% imalo je uvećanu i jetru i slezinu. U hematološkim nalazima kod 51,1% bolesnika zabeležen je pad Er, dok je kod 50,5% zabeležena trombocitopenija.

Kod 53 bolesnika primenjene su sve četiri metode dijagnostike. Pošto nijedna od primenjenih metoda nije imala apsolutnu tačnost, završna dijagnoza malarije postavljena je na osnovu rezultata mikroskopije, brzog antigenskog testa, skrining i specijes-specifičnog qPCR-a uz uvažavanje kliničkog stanja bolesnika. Takođe, uvaženi su nalazi konvencionalnog PCR-a u pogledu identifikacije vrsta dobijeni za 11 uzoraka ispitivanih u Švedskoj. Saglasno ovoj analizi završna dijagnoza malarije postavljena je kod 45 bolesnika. Kod 64 ispitanika isključena je dijagnoza malarije, uključujući 24 bolesnika sa dijagnozom *status post malariam*, od kojih je sedam na prijemu imalo febrilnost za koju je naknadno utvrđena druga etiologija. Među uzrocima kliničke bolesti bolesnika kod kojih nije dokazana malarija, dominirale su virusne respiratorne infekcije gornjih disajnih puteva, bronhopneumonija i crevne infekcije.

Da bi se uporedno analizirao dijagnostički značaj svih primenjenih metoda, neophodna je prvo njihova pojedinačna analiza.

Jednokratnom mikroskopijom može se dijagnostikovati ali ne i isključiti malarija, naročito kod imunizovanih i delimično imunizovanih bolesnika koji mogu imati nisku parazitemiju. Preporuka američkog Centra za kontrolu i prevenciju bolesti (Centers for Disease Control and Prevention - CDC) je da se kod mikroskopski negativnih bolesnika klinički suspektnih na malariju mikroskopija ponavlja na 12 - 24 sata, i da se malarija može isključiti tek nakon tri negativna nalaza unutar 72 sata.



Preporučuje se i učestalije ponavljanje mikroskopije, na 6 - 12 sati unutar prvih 48 sati (68). Rossi i sar. (2012) u Švajcarskoj zabeležili kod dva (0,1%) bolesnika pozitivan nalaz ponovljenim ispitivanjem prvog odnosno šestog dana kod 1987 povratnika iz endemskih područja, inicijalno negativnih mikroskopski i brzim testom na *P. falciparum* (121). Pasricha i sar. (2013) su u pet laboratorija u Melburnu zabeležili devet (3,5%) slučajeva malarije dijagnostikovane nakon negativnog prvog uzorka (sedam *P. vivax*, po jedna *P. ovale* i *P. falciparum*). Četiri bolesnika sa *P. vivax* infekcijom imali su podatak o nedavnom korišćenju antimalarika (122).

U našem ispitivanju, kod 42 od 45 bolesnika malarija je mikroskopski potvrđena. Kod 41 bolesnika odmah je određena vrsta plazmodijuma, dok je kod jednog bolesnika sa izuzetno retkim parazitima vrsta određena nakon trećeg uzorkovanja, i u pitanju je bio *P. malariae*. Kod ove vrste je uobičajena niska parazitemija; štaviše, moguće su asimptomatske infekcije koje mogu perzistirati godinama (22). Cnops i sar. (2011) identifikovali su qPCR-om u 1,3% slučajeva vrstu plazmodijuma kod bolesnika koji su bili pod terapijom i kod kojih uočeni paraziti, morfološki izmenjeni, nisu mogli biti mikroskopski identifikovani (93).

Mikroskopski je kod 69,1% bolesnika nađen *P. falciparum*, *P. vivax* kod 7,1% a *P. ovale* i *P. malariae* kod 9,5%. Kod dva bolesnika postavljena je dijagnoza mešane infekcije (*P. malariae* i *P. vivax* odnosno *P. falciparum* i *P. vivax*). Kod tri (6,7%) bolesnika dijagnoza je indirektno potvrđena adekvatnim terapijskim odgovorom nakon primenjene terapije antimalaricima a nemogućnost detekcije plazmodijuma bilo je posledica započete terapije. Mikroskopijom malarija nije potvrđena kod 61,5% ispitanika, uključujući i odsustvo seksualnih stadijuma plazmodijuma odgovornih za transmisiju malarije.

Parazitemiju  $\leq 2\%$  imalo je 88,1% bolesnika, uključujući 10 sa započetom terapijom antimalaricima pre ispitivanja. U ovoj kategoriji sedam bolesnika je imalo parazitemiju ispod 0,0004%, što je uslovljavalo potrebu dužeg mikroskopiranja većeg broja polja jer je zbog retkih i poluraspadnutih, morfološki izmenjenih parazita, bilo teško odrediti vrstu plazmodijuma. Kod 9,5% bolesnika parazitemija je bila između 2 i 5%. Samo je jedan bolesnik sa *P. falciparum* infekcijom imao visoku parazitemiju od 9,5%, što je posledica kasnog javljanja na pregled, 10 dana od početka tegoba.

Niska parazitemija se očekuje na početku infekcije, kod bolesnika koji su koristili hemioprofilaksu, kao i kod stanovništva endemskih područja. Međutim u našem istraživanju niska parazitemija je prevashodno beležena kod bolesnika koji su samoinicijativno započeli terapiju. Određivanje parazitemije je subjektivan postupak i koji god metod da se izabere moguće su greške, koje mogu biti sistemske ili slučajne. Sistemske greške su greške tehničkog osoblja i ogledaju se u vidu previše ili neadekvatno nanete krvi na pločicu, loše načinjenog krvnog razmaza kada su paraziti neravnomerno razmešteni u pretankom razmazu, ili zaklonjeni i teško uočljivi u debelom krvnom razmazu, ili lošeg bojenja. Takođe, različiti parazitolozi imaju različite individualne sposobnosti za precizno uočavanje i brojanje prisutnih parazita. Greške su najčešće kod niskih gustina parazita, blizu granice detekcije. Otuda do grešaka najčešće i dolazi na početku i na kraju praćenja parazitemije, kada je ona i najniža (123).

S obzirom na to da su ispitanici uključeni u ovu studiju pacijenti Klinike za infektivne i tropske bolesti primenjen je dijagnostički pristup već godinama ustaljen za izvođenje konvencionalne dijagnostike. Kod svih ispitanika je u radno vreme laboratorije na prijemu vršena mikroskopska dijagnostika malarije do nivoa vrste. Ukoliko se bolesnik javio na Kliniku van radnog vremena laboratorije, pozivan je parazitolog i mikroskopija je realizovana unutar tri sata po prijemu.

Kahama-Maró i sar. (2011) su u studiji baziranoj na ekspertskoj reviziji mikroskopije kod obolelih od malarije u Tanzaniji pokazali da je kvalitet mikroskopije u endemskim područjima nizak, sa osetljivošću od 71% i specifičnošću od 47% (124). U zemljama u kojima se malarija viđa samo kao importovana, često se klinički ne posumnja na malariju ili se načine dijagnostički propusti. Institut za kliničke i laboratorijske standarde (Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI) u Americi daje preporuke da laboratorije koje se bave dijagnostikom malarije treba da obezbede mogućnost 24-časovne dijagnostike 7 dana u nedelji od strane iskusnog osoblja. Preporučuje se pravljenje minimalno tri guste kapi i krvna razmaza, primena Gimza bojenja jer omogućava obojenost eritrocitnih granula kod *P. vivax* i *P. ovale*, i mikroskopiranje najmanje 300 vidnih polja na uveličanju x 100 pod imerzijom. Za određivanje parazitemije preporuka je da se pregleda najmanje 10 vidnih polja krvnog razmaza, a mnogo više polja kod pripadnika endemskih područja koji mogu imati nisku parazitemiju. Propisano je hitno javljanje mikroskopskog nalaza nadležnom kliničaru,

preliminarni izveštaj (pozitivan/negativan) treba da bude dostupan u roku od 4 sata, % parazitemije u roku od 6 sati a identifikacija vrsta unutar 24 sata (125). Mi smo sledili CLSI uputstva u pogledu određivanja parazitemije preko krvnog razmaza tako što smo za sve bolesnike brojali Er u 10 vidnih polja.

Retrospektivna studija Edsona i sar. (2010) o rezultatima eksterne kontrole u uspešnosti dijagnostike malarije u američkim laboratorijama pokazala je nesposobnost izvođenja mikroskopske dijagnostiku u 25% laboratorija, dok 36,1% laboratorija nije uspevalo da rezultat izdaju unutar 24 sata (126).

Obimno istraživanje u SAD-u kojim je obuhvaćena 201 laboratorija ovlašćena za dijagnostiku malarije pokazalo je da skoro sve laboratorije rade mikroskopiju na licu mesta, oko 50% molekularnu dijagnostiku, a samo 17% primenjuje brze testove. Samo pet laboratorija obavlja dijagnostiku 24 časa dnevno, 7 dana u nedelji. Čak 73% laboratorija zabeležilo je manje od pet slučajeva malarije tokom 12 meseci istraživanja. U 28% slučajeva rezultati identifikacije vrsta trajali su više od 24 sata po prijemu (127).

I u kanadskim laboratorijama zabeleženo je 1997. godine čak 27% grešaka (128). Milne i sar. (1994) analizirali su uspešnost mikroskopije u dve laboratorije u Londonu i našli da su greške bile najzastupljenije u identifikaciji *P. ovale* (29,4% uspešnosti) i mešanih infekcija (svega 16,7%). Najuspešnije je detektovana vrsta *P. falciparum* sa 21% grešaka u identifikaciji (129). Greške su tumačene nedovoljnim iskustvom laboratorijskog osoblja i ukazuju na potrebu učestalijih treninga (126, 128, 129). Najuspešniju detekciju vrste *P. falciparum* zabeležili su i Edson i sar. (2010) u SAD ali i za tu vrstu zabeleženo je 11,2% neuspeha (126).

Shodno preporukama SZO da se kod bolesnika sa sumnjom na malariju pre započinjanja terapije, uz mikroskopiju primenjuju i brzi testovi, u našoj laboratoriji za dijagnostiku malarije pre više godina uveden je i brzi test. Pošto možemo da koristimo samo testove registrovane u Srbiji, u ovoj studiji evaluirana je uspešnost rutinskog testa za detekciju HRP2 antigena *P. falciparum*. Test je bio pozitivan kod 35 bolesnika, i to kod 29 sa mikroskopski uočenim *P. falciparum*-om, tri bolesnika sa *ex iuvantibus* dijagnozom i kod tri zdrava ispitanika sa nedavno lečenom malarijom iz grupe epidemiološkog nadzora. Ova tri pozitivna nalaza su posledica prolongirane antigenemije što je uobičajeno za ovaj antigen (68, 75), ali sa kliničkog aspekta su lažno

pozitivni. Nije bilo lažno pozitivnih rezultata kod ne-*falciparum* infekcija uključujući i jednog bolesnika sa mikroskopski mešanom infekcijom (Pf + Pv), za koga je specijes-specifičnim qPCR-om i revizijom mikroskopije pokazano da nema *P. falciparum*. Time je pokazana prednost ovog testa kod mikroskopskih dilema u pogledu prisustva najmalignije vrste plazmodijuma koje treba brzo razrešiti.

Najveća prednost ovog testa je što pouzdano u roku od 20 minuta isključuje najmaligniju vrstu plazmodijuma. Nije propuštena nijedna *P. falciparum* malarija uključujući i one sa niskom parazitemijom ispod praga osetljivosti brzih testova (75, 68). Odlična osetljivost i kod niskih parazitemija posledica je započetog lečenja antimalaricima tj. već oslobođenih značajnih količina HRP2 antigena. Iako je brzi test korišćen samo za inicijalnu dijagnostiku, njegova primena i kod bolesnika sa nedavno lečenom malarijom koji su se javljali na proveru nalaza, potvrdila je da se HRP2 antigenemija održava dugo nakon terapije antimalaricima i može davati lažno pozitivne nalaze, što je zabeleženo kod tri bolesnika, a kod jednog od njih antigenemija se održavala i nakon mesec dana od završenog lečenja kininom. Poznato je da se posle lečenja kininom klirens parazita postiže kasnije (47), zbog čega je i održavanje HRP2 antigenemije duže.

RDT je koristan za isključivanje mešanih infekcija sa *P. falciparum*-om, jer je kod prisustva retkih parazita naročito u stadijumu mladih trofozoita teško odrediti vrstu mikroskopijom. Zbog ograničenih finansijskih sredstava, u našem dosadašnjem laboratorijskom protokolu brzi test je kod suspektih slučajeva primenjivan samo za prvi uzorak dok je u narednim uzorcima vršena samo mikroskopija. Pasricha i sar. (2013) smatraju da je u eri istovremene primene mikroskopije i brzih testova, kod bolesnika koji nemaju podatak o nedavnoj primeni antimalarika, negativan nalaz sa obe ove metode pouzdan u isključivanju malarije ali ostaje opravdanost višekratnog ponavljanja dijagnostike kod onih koji su nedavno lečeni od malarije ili su bili na profilaktičkom tretmanu antimalaricima (122).

Upotreba brzih testova znatno je povećana poslednjih godina, a znatno je unapređen i njihov kvalitet (8). Generalno je putnicima pristup samolečenja malarije nakon samodijagnostike ove infekcije (*stand-by emergency treatment* - SBET) privlačniji od klasične hemioprofilakse. Devedesetih godina započeta je propaganda o ličnoj upotrebi brzih testova od strane putnika, ali su brojne studije o propustima u

smislu lažno pozitivnih i negativnih nalaza dovele u pitanje ovaj trend. Takođe, za tumačenje nalaza brzog testa neophodna je detaljna anamneza i procena kliničkog stanja bolesnika uključujući nalaz hematoloških i biohemijskih analiza, što donekle onemogućava samostalno korišćenje i tumačenje brzih testova od strane samih putnika. Maltha i sar. (2013) su u Belgiji, analizom osam različitih brzih testova na 90 uzoraka krvi pozitivnih na *Plasmodium* i deset negativnih kontrola, našli veliku varijabilnost u kvalitetu testova, kao i brojne propuste u preporukama za čuvanje reagenasa, za upotrebu i tumačenje rezultata. Za šest od osam brzih testova zabeležena je 100% osetljivost za *P. falciparum* dok su dva testa pokazala lažnu pozitivnost od 80% odnosno 70% kod negativnih uzoraka. Tri brza testa detektovala su sve uzorke sa *P. vivax*-om, dok je detekcija *P. ovale* i *P. malariae* generalno bila loša. Čak kod sedam od osam testova zabeležena je pojava pozitivnosti nakon zadatog vremenskog okvira za očitavanje čime se samokorisnici mogu dovesti u zabludu (130).

Međutim, kao glavni nedostatak brzih testova ostaje slaba osetljivost kod niskih parazitemija, što je problem koji treba da bude prevaziđen novim generacijama testova, a SZO planira da do kraja 2015. godine obezbedi kontinuirano snabdevanje ovim testovima endemska područja u cilju povećanja parazitološke potvrde malarije (131).

Ispitivanjem inicijalnih uzoraka 109 bolesnika skrining qPCR-om dobijen je pozitivan nalaz kod 51 bolesnika što je uključivalo sve bolesnike sa mikroskopski pozitivnim nalazom, dva bolesnika sa *ex iuvantibus* dijagnozom kao i sedam bolesnika iz grupe epidemiološkog nadzora. Nalaz na specijes-specifičnom qPCR-u kod svih ovih sedam bolesnika bio je negativan. Četiri klinički zdrava bolesnika su imala uputnu dijagnozu nedavno lečene malarije, te se pozitivnost na skrining qPCR-u može objasniti visokom osetljivošću ovog testa koji može detektovati nizak nivo aseksualnih stadijuma parazita kao i gametocita u mikroskopski nedetektabilnom nivou (7) ili cirkulišuće ostatke DNK terapijom oštećenih parazita, što je klinički gledano nedostatak metode (132). Pozitivnost ostala tri ispitanika koji su boravili u tropima duže od 6 meseci, ostaje nejasna, a kod dvoje od njih, dokazana je virusna infekcija kao uzrok febrilnosti. Svi su na skrining qPCR-u imali  $C_T$  vrednost preko 39,6; srednja  $C_T$  vrednost za bolesnike sa malarijom bila je značajno niža ( $P < 0,03$ ) od srednje  $C_T$  vrednosti za sedam bolesnika kod kojih je malarija isključena (25,64 prema 38,40). Granična pozitivnost

ova tri ispitanika može biti posledica kontaminacije u postupku izvođenja testa, unakrsne pozitivnosti sa DNK drugih homologih eukariotskih vrsta koje mogu biti uzročnici inaparentnih infekcija (aspergiloza, toksoplazmoza, lajšmanioza, neosporioza, *P. jirovecy* infekcija) (100), ili posledica prisustva mikroskopski nedetektabilnih gametocita ili niske parazitemije kod asimptomatske infekcije imunizovanih osoba naročito sa *P. malariae* koja u toj formi može perzistirati godinama (22). Poslednji razlog je malo verovatan zbog dobre analitičke osetljivosti specijes-specifičnog qPCR za *P. malariae* (0,09%).

Ostaje dilema zašto jedan uzorak kod bolesnika sa *ex iuvantibus* dijagnozom *falciparum* malarije nije bio pozitivan i na skrining qPCR-u kao osetljivijoj metodi. Cnops i sar. (2011) ukazuju na to da su mogući slučajevi nedetektabilnosti mikroskopski potvrđene malarije PCR-om kao posledica degradacije DNK ili inhibicije PCR amplifikacije (93). Međutim kako je ovaj uzorak bio pozitivan na naknadno rađenom specijes-specifičnom qPCR-u i brzim testom za *P. falciparum*, verovatnija je mogućnost tehničke greške.

Negativan nalaz na skrining qPCR-u imalo je 58 ispitanika. Kod 56 je, shodno negativnoj mikroskopiji, dijagnoza malarije time i isključena, dok su dva bolesnika zbog pozitivnog nalaza na brzom testu uključena u molekularnu dijagnostiku do nivoa vrste. Jedan je bio negativan a drugi (lažno) pozitivan za *P. falciparum* kao posledica rezidualne DNK nakon nedavno lečene malarije. Četiri bolesnika iz kontrolne grupe za proveru specifičnosti skrining qPCR testa imali su negativan nalaz na skrining qPCR-u.

Ispitivanjem 53 uzorka specijes-specifičnim qPCR-om dobijena su 43 pozitivna nalaza, sa srednjom  $C_T$  vrednošću od 26,33. Kod 33 bolesnika nađen je *P. falciparum*, *P. ovale* kod četiri, a *P. vivax* i *P. malariae* kod po tri bolesnika. Srednje  $C_T$  vrednosti po vrstama bile su ujednačene (*P. falciparum* 26,27, *P. ovale* 28,27, *P. vivax* 25,06 i *P. malariae* 25,67). Nije detektovana nijedna mešana infekcija. Mikroskopski su proglašene dve mešane infekcije što je opovrgnuto nakon dobijanja rezultata molekularne dijagnostike, naknadnim bojenjem i mikroskopijom rezervnih preparata od strane dva parazitologa. Pre izvođenja molekularne dijagnostike, očekivanja su bila da će biti detektovano više mešanih infekcija nego što smo dobili mikroskopijom. Generalno, proporcija mešanih infekcija detektovanih molekularnim metodama u



neendemskim područjima je viša nego mikroskopijom i varira od 5% do 12% (95, 117, 23). Univerzalni prajmeri za *Plasmodium* generišu kompeticiju kod mešanih infekcija, što može dati lažno negativne rezultate kod mešanih infekcija za manje zastupljenu vrstu (95, 100). Rougemont i sar. (2004) detektovali su samo četiri od 14 prisutnih mešanih infekcija (100). Shokoples i sar. (2009) modifikovali su ovaj protokol u cilju prevazilaženja kompeticije DNK manje zastupljenih vrsta u mešanim infekcijama, uključivanjem specijes-specifičnih *forward* prajmera u kombinaciji sa konzerviranim *reverse* prajmerima i specijes-specifičnim probama u jednoj reakciji, i tako identifikovali 13 od 16 mešanih infekcija (101). Da bi izbegli ovu kompeticiju, Cnops i sar. (2011) razvili su qPCR po formatu Rougemont i sar. (2004) koristeći novo-dizajnirane specijes-specifične prajmere u kombinaciji sa specijes-specifičnim probama i reverznim *plasmo2* (93). Novorazvijeni PCR pokazao se boljim za detekciju mešanih infekcija od pan-prajmer qPCR-a po Rougemont-u. Zabeležena je dvostruko učestalija detekcija mešanih infekcija PCR-om nego mikroskopijom, a naročito je značajno da je u 11 mešanih infekcija *P. falciparum* bio manje zastupljena vrsta kao posledica niske parazitemije (93). Ako se uzme u obzir mogućnost kompeticije, ostaje otvoreno pitanje da li je molekularnom detekcijom propuštena neka manje zastupljena vrsta roda *Plasmodium*. Interesantno je da u našem istraživanju kod 11 bolesnika sa malarijom konvencionalnim PCR-om u Švedskoj nije dokazano prisustvo mešanih infekcija, iako je ova metoda zlatni standard u molekularnoj detekciji mešanih infekcija (101). Pretpostavljamo da *P. malariae* nije propušten kao manje zastupljena vrsta zbog primene *minor groove binding nonfluorescent quencher* (MGBNFQ) na probi za *P. malariae* kojim se eliminiše kompeticija. Nekoliko vrsta prigušivača može biti korišćeno za TaqMan® qPCR protokole. *Applied Biosystems* imaju probe sa MGBNFQ ili TAMRA kao prigušivačima. MGB je ne-fluorescentni prigušivač koji povećava  $T_m$  (melting temperature) probe. MGB probe su kraće od ostalih tipova proba, duge 13 - 18 nukleotida i formiraju stabilne duplekse sa jednolančanom DNK koja je meta. Njihova primena povećava specifičnost i efikasnost u odnosu na obične DNK probe (133). Ovi podaci ukazuju na dinamične promene u cilju unapređenja molekularne dijagnostike malarije i potrebu stalnog praćenja novih naučnih dostignuća u ovoj oblasti.

Korelacijom  $C_T$  vrednosti dobijenih skrining i specijes-specifičnim qPCR-om nađeno je da između ove dve metode postoji umeren stepen korelacije (Pirsonov koeficijent korelacije  $r=0,669$ ,  $P<0,001$ ,  $r^2=0,447$ ), tj. da obe imaju sličnu osetljivost. Oba molekularna postupka, skrining i specijes-specifični qPCR, izvođeni su do 45 ciklusa iako su pozitivnim smatrani uzorci kod kojih je eksponencijalni rast beležen do 40 ciklusa što je prihvaćeno kao naučni konsenzus (134). Produžetak na 45 ciklusa je bio preventivan u očekivanju eventualnog eksponencijalnog rasta, što je primenjivano u drugim istraživanjima (100, 101), ali nismo zabeležili kasnu pojavu signala kod akutnih slučajeva malarije, sem kod tri slučaja rekonvalescenata kod kojih je to bila posledica rezidualne DNK-nemije koja nije korelirala ni sa mikroskopskim nalazom, ni sa kliničkim pogoršanjem niti sa hematološko-biohemijskim promenama. Pomenuti produžetak amplifikacije na 45 ciklusa je naročito bitan zbog eventualnog eksponencijalnog rasta manje zastupljene vrste plazmodijuma kod mešanih infekcija (101), ukoliko terapijskim protokolom nisu obuhvaćene obe vrste. Mangold i sar. (2005) nisu, koristeći 35 ciklusa kao graničnu vrednost za pozitivne uzorke, qPCR-om detektovali dve *P. falciparum* malarije sa mikroskopski procenjenom parazitemijom od 0,01% čak i kada je količina DNK u radnom protokolu povećana sa 2 na 5  $\mu$ L (99). Rantala i sar. (2010) su podizanjem granične  $C_T$  vrednosti na 38 ciklusa povećali specifičnost primenjenog qPCR-a za dijagnostiku malarije u poređenju sa mikroskopijom sa 91,2% na 94,6%, dok je osetljivost ostala nepromenjena (111).

Sve navedeno ukazuje na snažnu potrebu razvoja protokola adaptiranih za detekciju vrsta roda *Plasmodium* pre uvođenja u rutinsku kliničku dijagnostiku. Neophodno je dobro poznavanje svih potencijalnih uzroka diskrepanci između rezultata dobijenih mikroskopijom, brzim testom i PCR-om za konačno tumačenje nalaza. Morassin i sar. (2002) daju moguća tumačenja rezultata kod različitih grupa obolelih, delimično imunizovanih stanovnika tropskih krajeva, bolesnika sa dijagnostikovanom malarijom pre započinjanja terapije, kao i onih koji su započeli terapiju ili su koristili hemioprofilaksu (94). Pozitivan PCR bez potvrde klasičnim metodama kod putnika sa kliničkom slikom malarije koji su bili pod hemioprofilaksom treba potvrditi sekvenciranjem. Negativni PCR rezultati delimično imunizovanih putnika mogu biti posledica stečenog imuniteta i posledične niske parazitemije (94). Takođe, negativni



rezultati na PCR-u mogu biti posledica lošeg kvaliteta dugo skladištenih uzoraka krvi (49), posledica degradacije DNK, prisustva inhibitora ili zbog vrlo male količine DNK (135).

U ovom istraživanju osetljivost skrining qPCR-a iznosila je 0,04 par/ $\mu$ L, dok je analitička specifičnost bila 100%. Osetljivost za specijes-specifični qPCR bila je 6 par/ $\mu$ L za *P. falciparum*, 0,30 za *P. vivax*, 0,13 za *P. ovale* i 0,09 par/ $\mu$ L za *P. malariae*. Nije bilo pozitivnih signala u kontrolnoj grupi zdravih bolesnika koji nisu boravili u malaričnom području.

Većina qPCR protokola koncipirani su da detektuju 18S rRNK gen plazmodijuma, ali ciljni geni mogu biti i drugi npr mitohondrijalni geni, *var* i *stevor* geni (100, 113, 136). qPCR protokoli mogu biti tzv. monopleks, gde se amplifikuje jedan gen, ili multipleks, kojima se amplifikuje dva ili više ciljnih gena. Kod monopleks protokola prag osetljivosti ide od oko 0,002 do 30 par/uL (83, 113) dok je osetljivost multipleks protokola od 0,2 do 5 par/uL (51, 83, 92, 113, 137). Hermsen i sar. (2001) i Lee i sar. (2002) su ranije opisali qPCR protokole kojima su postigli prag osetljivosti (138, 139) od 0,02 par/uL odn. 0,1 par/uL, pri čemu su obe studije ciljale rRNK gene. Nedavno su Farrugia i sar. (2011) opisali monopleks test koji je usmeren na detekciju *citohrom b gen* (*ctib*) sa granicom detekcije od 0,05 par/uL (136).

Razlike u osetljivosti u navedenim studijama posledica su brojnih elemenata od razlika u prostoru, uslovima i vremenu izvođenja, količine krvi upotrebljene za ekstrakciju DNK i samom postupku ekstrakcije DNK, opsegu razblaženja, upotrebe različitih reagenasa, instrumenata, programa, standarda za kvantifikaciju, metoda analize, tumačenju podataka i mnogih drugih detalja (140, 141) uključujući i iskustvo u molekularnoj dijagnostici.

Zbog nedostatka standardizovanih metoda qPCR-a za dijagnostiku malarije, teško je proceniti i uporediti kvalitet rada objavljenih studija a naročito je teško primeniti unakrsnu analizu ili uvek reprodukovati postupak (140). U toku su napori da se usaglase molekularni testovi koji se koriste u dijagnostici malarije a unutar toga i kvantifikacija parazitemije. Do sada je relativna kvantifikacija, preko serijskih razblaženja DNK iz uzorka sa poznatom parazitemijom prethodno određenom mikroskopski, korišćena kao standard za utvrđivanje parazitemije iz nepoznatog uzorka

(83, 100, 136, 139). Kamau i sar. (2013) su prvi upotrebili, i preporučili, plazmide DNK za apsolutnu kvantifikaciju parazita malarije (142). Jedna kopija plazmida DNK odgovara 0,1 par/ $\mu$ L *Plasmodium* spp, odnosno 0,281 par/ $\mu$ L za *P. falciparum* i 0,127 par/ $\mu$ L za *P. vivax*.

Pošto nijedna od primenjenih metoda nije imala apsolutnu tačnost, završna dijagnoza malarije postavljena je na osnovu rezultata mikroskopije, brzog antigenskog testa, skrining i specijes-specifičnog qPCR-a, uz uvažavanje kliničkog stanja bolesnika. Nakon analize grešaka načinjenih mikroskopijom i evaluacije rezultata 11 uzoraka ispitivanih konvencionalnim PCR-om u Švedskoj, nalaz specijes-specifičnog qPCR-a prihvaćen je kao standard za identifikaciju vrsta. Načinjena su tri izuzetka gde je prihvaćen nalaz mikroskopije jer je izostala detekcija PCR signala. Saglasno ovoj analizi završna dijagnoza malarije postavljena je kod 45 bolesnika a revizijom mikroskopije, konačna zastupljenost vrsta roda *Plasmodium* odstupala je od prvobitnog mikroskopskog nalaza. Završnu dijagnozu *P. falciparum* infekcije imalo je 71,1% bolesnika uključujući i troje bez mikroskopske potvrde, *P. vivax* dijagnostikovano je u 8,9% slučajeva, *P. ovale* u 13,3% a *P. malariae* u 6,7% slučajeva. *P. falciparum* je najzastupljenija importovana vrsta plazmodijuma i u zemljama u okruženju (143, 144), sa udelom od 61,8% između 1987. i 2011. godine u Hrvatskoj (145). Slična situacija je i u zemljama zapadne Evrope (93, 118, 121, 146) i severne Amerike (112).

Kod 45 bolesnika sa malarijom, slaganje mikroskopije i specijes-specifičnog qPCR-a zabeleženo je kod 33 (73,3%) bolesnika. Od 12 slučajeva nepoklapanja, šest su posledica netačne mikroskopske identifikacije vrste plazmodijuma. Kod dve mikroskopski uočene mešane infekcije radilo se o mono infekciji, pri čemu je bila tačno određena po jedna vrsta. U dva slučaja zamenjene su vrste *P. ovale* i *P. vivax* a u dva slučaja *P. ovale* proglašen je za *P. malariae*. Svih šest grešaka desile su se tokom vanrednih dolazaka van radnog vremena, u vreme kada nije bilo moguće uticati na kvalitet napravljenih preparata.

Ostalih šest slučajeva nepoklapanja obuhvataju tri slučaja malarije detektovana mikroskopski ali ne i specijes-specifičnim qPCR-om (dve *P. ovale* infekcije nedetektovane zbog odabira neadekvatnih prajmera, i jedne *P. vivax* nedetektovane

zbog zakasnelog uzimanja uzorka krvi za molekularnu dijagnostiku) i tri (6,7%) slučaja SMM.

Problem SMM, kod koje je gustina prisutnih parazita niska tj. ispod nivoa osetljivosti mikroskopije, aktuelizovan je uvođenjem molekularne dijagnostike. SMM je uobičajena pojava u endemskim područjima i javlja se u 13 - 33% svih slučajeva malarije (67, 147, 148, 149, 150) što je uslovljeno imunizovanošću. Međutim, sa aspekta importovanja malarije u neendemska područja ovo je dijagnostički vrlo delikatna kategorija. Ramírez-Olivencia i sar. (2012) su u retrospektivnoj studiji analize uspešnosti dijagnostike importovane malarije kod 293 bolesnika u Madridu, mikroskopski i konvencionalnim PCR-om, našli 35,5% slučajeva SMM (pozitivni na PCR-u, negativni mikroskopijom), a dominantan uzročnik bio je *P. falciparum* (86,5%). Simptomi (febrilnost, astenija, glavobolja) su bili prisutni kod svega 28,8% bolesnika. Tropska splenomegalija je bila prisutna kod 13,3% ispitanika sa SMM, što je dramatično učestalije nego među bolesnicima sa mikroskopski potvrđenom malarijom (1,8%). SMM je bila zastupljenija kod delimično imunizovanih bolesnika (imigranti iz endemskih područja i putnici koji su boravili preko dve godine u endemskom području) a znatno manje među neimunizovanim putnicima (19,4%), koji su u tropima boravili manje od dve godine (66).

U vreme pre uvođenja molekularne dijagnostike, od 2001. do 2009. godine, na 102 klinička slučaja malarije zabeležili smo 11 (10,8%) bolesnika kod kojih mikroskopski nisu uočeni plazmodijumi, među kojima je bilo i pet bolesnika koji su se javili na pregled nakon započete terapije. Ovo je tumačeno ograničenom osetljivošću mikroskopije ali i neiskustvom parazitologa zbog malog broja importovanih slučajeva i nedostatka internacionalnih treninga (30), tako da sadašnji pad SMM na 6,7% možemo tumačiti većim dijagnostičkim iskustvom.

Ako zastupljenost pojedinih vrsta roda *Plasmodium* uporedimo sa sopstvenim rezultatima u periodu pre molekularne dijagnostike od 2001. do 2009. godine uočljivo je odsustvo mešanih infekcija i porast učešća *P. malariae* sa 1% na 6,7% i *P. ovale* sa 1% na 13,3% (30).

Smatra se da vešt, dobro obučeni parazitolog može da prepozna vrstu već u gustoj kapi sa relativno niskom gustom, a da proveru vrste vrši mikroskopijom krvnih razmaza. Većina grešaka u pogledu identifikacije vrsta odnosi se na nemogućnost razlikovanja morfološki sličnih vrsta (*P. vivax* i *P. ovale*) i morfološki sličnih stadijuma pojedinih vrsta (*P. knowlesi* prema *P. malariae* i *P. falciparum*) (24). Mlade trofozoite *P. knowlesi* teško je razlikovati od prstenastih oblika *P. falciparum* dok je zrele trofozoite, šizonte i gametocite *P. knowlesi* teško razlikovati od *P. malariae*. U rutinskoj mikroskopskoj praksi često se javlja i problem diferenciranja dve najzastupljenije i morfološki različite vrste, *P. falciparum* i *P. vivax* (151, 129). Među najčešće mikroskopske greške ubraja se i problem detekcije mešanih infekcija odnosno previd manje zastupljene vrste (129).

Jedna nedavna studija pokazala je da je preko 17% mikroskopski identifikovanih vrsta korigovano nakon primene PCR-a a da nivo greške kod identifikacije *P. falciparum* vrsta varira od 20 - 50% (113).

Dormond i sar. (2011) našli su podudaranje rezultata mikroskopije i multiplex PCR-a u 89% (73/82) analiziranih slučajeva malarije. Šest od devet slučajeva nepoklapanja odnosio se na mešane infekcije (90). Istraživanja slična našem protokolu pokazala su usklađenost između mikroskopije i qPCR-a od 86% (92) odnosno 71% (100). U našem radu podudaranje za 45 slučajeva malarije je bilo 73,3%. Analizirano po vrstama, za 32 bolesnika sa dokazanom *P. falciparum* malarijom podudaranje je bilo 90,6% (29/32), kao posledica nedetektabilnosti tri slučaja SMM *P. falciparum* kod kojih je dijagnoza postavljena *ex iuvantibus*.

Najmanje poklapanje (16,7%) između metoda zabeleženo je kod detekcije *P. ovale* što je uslovljeno mikroskopskim greškama ali i izborom prajmera. Upotrebljenim prajmerima nije bilo moguće detektovati obe podvrste, i *P. ovale curtisi* (*Poc*) i *P. ovale wallikeri* (*Pow*) (17, 19, 96). Jedna greška je načinjena kao posledica morfološke sličnosti vrsta; naime, mikroskopski je viđen *P. vivax* a specijes-specifičnim qPCR-om dokazano je da je u pitanju *P. ovale*. Međutim, kod jednog bolesnika je u dva navrata došlo do zamene *P. ovale* sa *P. malariae* a analiza ove greške ukazuje na klinički značaj tačne identifikacije vrsta. Ova greška retrospektivno je analizirana nakon uvođenja qPCR-a. Mikroskopijom rezervnih preparata zaključeno je da je netačna identifikacija

vrste usledila zbog tehničkih grešaka i to u postupku uzorkovanja (debeo krvni razmaz) i u postupku bojenja preparata (nizak pH destilovane vode pri pravljenju radnog rastvora Gimze što je uslovalo neobojenost *Schüffner*-ovih granula). Takođe, parazitirani Er nisu bili uvećani i bio je prisutan mali broj plazmodijuma jer je bolesnik već bio započeo terapiju. Neidentifikovanje *P. ovale* je dovelo do toga da nije data terminalna terapija primakvinom kojom bi se eliminisale uspavane forme u jetri, što je uslovalo relaps nakon 4 meseca. I ovaj put mikroskopski je proglašen *P. malariae* kao posledica vrlo retkih plazmodijuma i neuočenih *Schüffner*-ovih granula ali je nakon rezultata specijes-specifičnog qPCR-a da se radi o *P. ovale*, ordiniran i primakvin. Međutim, važno je pomenuti da se relapsi beleže i kod bolesnika kojima se ordinira 14-dnevna terminalna terapija primakvinom jer se dešava da bolesnici u kućnim uslovima ne koriste preporučenu terapiju ili je subdoziraju (152).

Zamena *P. ovale* i *P. vivax* posledica je njihove morfološke sličnosti, malog broja importovanih slučajeva i nedovoljnog treninga parazitologa na inostranim radionicama. Ovo je i jedna od najčešćih grešaka u identifikaciji vrste *Plasmodium* spp. (92, 100, 153). Generalno, mikroskopska dijagnostika *P. ovale* je teška zbog niske parazitemije, mogućnosti prisustva kao minorne vrste u mešanim infekcijama, morfološke sličnosti sa *P. vivax* i slabe osetljivosti brzih testova za ovu vrstu (23). Svetske studije ukazuju na visok procenat grešaka u mikroskopskom razlikovanju ove dve vrste (73, 113); tako su Cnops i sar. (2011) našli pomoću qPCR-a 11,4% grešaka ovog tipa (93). Morassin i sar. (2002) koji su u svom istraživanju na uzorku od 529 slučajeva malarije našli svega 2,64% *P. ovale* i *P. vivax*, navode da problem razlikovanja *P. ovale* i *P. vivax* može biti posledica neistreniranosti parazitologa jer se ove vrste generalno retko detektuju a kada su prisutni samo mladi trofozoiti gotovo ih je nemoguće razlikovati (94). Međutim, zamena ove dve vrste s obzirom na isti terapijski pristup nema kliničke posledice. Ozbiljnija je greška zamena *P. malariae* i *P. ovale*.

Kod tri bolesnika sa *P. malariae* malarijom podudaranje metoda je bilo 66,7%; mikroskopski je u jednom slučaju uočena mešana infekcija (Pm + Pv) ali je specijes-specifičnim qPCR-om pokazano da je u pitanju samo *P. malariae*.

Stvarno slaganje ove dve metode na 53 ispitivana uzorka bilo je 76,4%. Analizirano po vrstama plazmodijuma najbolje stvarno slaganje ove dve metode

postignuto je kod vrste *P. malariae* 94,6%, zatim kod *P. falciparum* i *P. vivax* od 90,9%, a najmanje kod *P. ovale* 89,1%. Međutim, zbog malog broja nefalciparumskih vrsta ovi rezultati sem za *P. falciparum* nisu realni.

Razlog za to što je najbolje slaganje metoda postignuto za *P. falciparum* leži u tome što je ova vrsta najzastupljenija što uslovljava i najbolju izvežbanost parazitologa za identifikaciju ove vrste. Takođe, ova vrsta je često praćena višom parazitemijom što olakšava nalaženje morfološki tipičnih oblika. Dalje, u rutinskoj laboratorijskoj praksi uz mikroskopiju se godinama unazad primenjuje brzi test za detekciju specifičnog HRP2 antigena ove vrste čime se potpomaže nalaz mikroskopije. Između specijes-specifičnog qPCR-a za detekciju *P. falciparum* sa brzim testom za detekciju HRP2 antigena ove vrste, postignuto je stvarno slaganje od 96,2%, dok je stvarno slaganje između mikroskopije i brzog testa bilo 92,9% što ukazuje na prednost paralelne primene ove dve metode za inicijalnu dijagnostiku kod sumnje na *falciparum* malariju.

Odlične performanse primenjenog brzog testa, koji se nalazi na listi SZO i CDC-a (dostupno na:

[http://www2.wpro.who.int/internet/resources.ashx/RDT/docs/MD\\_table34+%281%29\\_totallistofISO131485criteria.pdf](http://www2.wpro.who.int/internet/resources.ashx/RDT/docs/MD_table34+%281%29_totallistofISO131485criteria.pdf);

<http://www.cdc.gov/dpdx/diagnosticProcedures/blood/antigen-detection.html>)

preporučuju ga za inicijalnu dijagnostiku vrste *P. falciparum*. Dugo trajanje HRP2 antigenemije kod bolesnika sa nedavno lečenom *P. falciparum* malarijom diskvalifikuju ga međutim za praćenje efekata primenjene terapije (75).

Uvođenjem molekularnih metoda detekcije vrsta plazmodijuma pokazana je viša prevalencija *P. malariae* i *P. ovale* kao i genetski polimorfizam *P. malariae* a naročito *P. ovale* (19). Vrsta *P. ovale* bila je do sada potcenjena kako u pogledu geografske distribucije (17, 18, 20, 21, 19) tako i u pogledu težine kliničke slike (49). Zbog niske parazitemije, tek je uvođenjem molekularne dijagnostike pokazano znatno veće učešće *P. ovale* kao uzročnika malarije, naročito kao minorno zastupljene vrste unutar mešanih infekcija (23).

Ispostavilo se da brojni izolati *P. ovale* uočeni mikroskopski nisu mogli biti detektovani pojedinim PCR protokolima (96). Uočena je heterogenost male subjediničice (*SSUrRNA* - *small subunit ribosomal RNA*) rRNK gena *P. ovale* (19, 154) a daljim istraživanjima pokazano je da genetski polimorfizam ove vrste ima značajan upliv na

osetljivost molekularne dijagnostike što je uslovalo potrebu dizajniranja novih oligonukleotidnih prajmera. Genetski polimorfizam koji je često prisutan kod *P. ovale* i ređe kod *P. malariae* nije prisutan kod *P. falciparum* i *P. vivax* što ukazuje na njihov različit filogenetski razvoj (96). Calderaro i sar. (2007) su retrospektivnom primenom *nested* PCR-a sa novim setom prajmera (NP-2005) za *P. ovale*, koji prevazilaze polimorfizam *ssrRNA* gena, našli više *P. ovale* nego što je ranijim prajmerima detektovano, što ukazuje na postojanje dve varijante *P. ovale*. Da varijante *P. ovale* nisu ograničene samo na JI Aziju već ih ima i u zapadnoj Africi pokazala su istraživanja Calderaro i sar. (2007) na uzorcima importovane malarije u Italiji (96). Sutherland i sar. (2010) su molekularnom analizom multilokusnih sekvenci šest genetskih markera 55 izolata *P. ovale* iz 12 afričkih i tri zemlje Azije našli dimorfizam svih šest genetskih karakteristika i predložili taksonomsku reviziju *P. ovale* na dve zasebne vrste: *P. o. curtisi* i *P. o. wallikeri* (18). Pretpostavka je da je evolutivna podela ove dve vrste nastala pre milion do 3,5 miliona godina u organizmu primata (17). Oguike i sar. (2011) su primenom konvencionalnog PCR-a za amplifikovanje dve nezavisne ciljne sekvence za razlikovanje *Poc* i *Pow* (ponovljeni region *poetra* i *powtra* gena), našli da ove dve vrste simultano cirkulišu u afričkim zemljama Kongu, Ugandi i E. Gvineji (17). Culleton-a i sar. (2008) su na 2.588 uzoraka iz afričkih zemalja našli 3,9% zastupljenosti *P. ovale* (155). U vrlo dinamičnom prilivu naučnih informacija o dijagnostici *ovale* malarije ispostavlja se da je naš protokol za detekciju *P. ovale* prevaziđen. U studiji Calderaro i sar. (2007) uočeno je a 2012. potvrđeno da je qPCR-om za detekciju *P. ovale* po protokolu Perandin-a i sar. (2004) moguće detektovati *P. o. curtisi* ali ne i *P. o. wallikeri* (96, 156). Pošto smo i mi za detekciju *P. ovale* koristili prajmere po protokolu Perandin-a i sar. (2004), ovo potvrđuje da su naša četiri detektovana slučaja *P. ovale* bili *P. o. curtisi* a dva nedetektovana *P. o. wallikeri*.

Za sada su retka saznanja o kliničkim razlikama između infekcija izazvanim ovim dvema vrstama *P. ovale*. Relativno visok nivo parazitemije zabeležen je kod bolesnika sa *Pow* infekcijom na Tajlandu (157). U Bangladešu od 13 bolesnika sa *Pow* i 10 sa *Poc* infekcijom, samo su četiri imala simptomatsku infekciju. S porastom broja putovanja raste i broj importovanih slučajeva *P. ovale* infekcija i do 8,8 %, pre svega iz zapadne Afrike (49, 158). Multicentrična retrospektivna studija sekvenciranja



importovanih *P. ovale* genotipova (21 *Poc* i 14 *Pow*) sprovedena u Španiji 2011. godine, podržava hipotezu da su *Poc* i *Pow* dve odvojene vrste (49). Trombocitopenija je značajno zastupljenija kod bolesnika sa *Pow* nego kod onih sa *Poc* infekcijom. Kod bolesnika sa *Pow* infekcijom uočeno je da su kraće boravili u Africi i da je kraći interval od povratka iz Afrike do pojave simptoma nego kod bolesnika sa *Poc* infekcijom; i u ispitivanju u Velikoj Britaniji je pokazano da je taj interval bio 40,6 dana za *Pow* prema 85,7 dana za *Poc* (159). Takođe, kod *Pow* infekcija zabeležen je niži nivo albumina, viša maksimalna temperatura (39,7°C prema 38,4°C) i više vrednosti transaminaza i markera hemolize (Hgb, LDH, bilirubin) dok su komplikacije i nivo parazitemije ujednačeno zastupljeni u obe grupe (49). Veća učestalost mučnine i povraćanja je zabeležena kod *Pow* infekcija nasuprot odsustvu istih kod *Poc* infekcija (49). Ovi podaci ukazuju na lakši prenos i neznatno veću patogenost *Pow* infekcije. Nolder i sar. (2013) analizom 74 *Poc* i 60 *Pow* infekcija nisu uočili morfološke razlike između ove dve vrste, ali su uočili da je dvostruko veći broj bolesnika sa *sensu lato ovale* malarijom koristio hemioprolaksu nego u kategoriji sa *falciparum* i *vivax* infekcijom (159).

Na uzorku od šest bolesnika (povratnika iz E. Gvineje) kod kojih smo dijagnostikovali *P. ovale*, od kojih za četiri pretpostavljamo da su *Poc* a dve *Pow*, ne može se donositi statistički značajan sud o kliničko-laboratorijskim različitostima. Nije bilo mikroskopski uočenih morfoloških razlika između dve vrste *P. ovale*. Kod dve *Pow* infekcije zabeležena je dvostruko niža srednja vrednost trombocitopenije (68,5 g/L) nasuprot ostale četiri *Poc* infekcije (112 g/L), kao i dvostruko kraće srednje vreme od dolaska u zemlju do pojave simptoma malarije kod *Pow* (82 dana) u odnosu na *Poc* infekcije (206,5 dana).

Srednje vreme trajanja parazitemije kod 45 bolesnika sa malarijom određene mikroskopski bilo je 2,2 dana a DNK-nemije određene skrining qPCR-om 7,9 dana. Najduža zabeležena parazitemija trajala je 5 dana a DNK-nemija  $\geq 28$  dana, u oba slučaja radilo se o *falciparum* infekcijama. Od dva bolesnika sa DNK-nemijom  $\geq 28$  dana, jedan je imao gametocite. Analizirano po vrstama, jedino je kod *P. falciparum* zabeležena izrazito značajna razlika u trajanju parazitemije i DNK-nemije, 1,9 prema 9,2 dana, što je posledica više parazitemije ove vrste i posledično veće količine rezidualne DNK koja se oslobađa iz raspadnutih parazita. S obzirom na to da je *P.*



*falciparum* bila dominantno zastupljena vrsta (n=32) to je uslovalo značajnu razliku između mikroskopske parazitemije i DNK-nemije u čitavoj grupi bolesnika sa malarijom. Takođe, u akutnoj *P. falciparum* infekciji gametociti nastaju 7 do 15 dana nakon parazitemije i prisutni su u rasponu od 2,5 do 22 dana, duže nego što je trajanje aseksualne parazitemije (160), čime se donekle može objasniti ovako dugo trajanje DNK-nemije.

Praćenje DNK-nemije ima ograničenu upotrebljivost i prolongirana pozitivnost mora se tumačiti na osnovu kliničkog stanja bolesnika jer može biti posledica različitih činilaca uključujući prisustvo gametocita i rezidualne DNK iz raspadnutih parazita kod lečenih bolesnika, što nema klinički značaj. S druge strane, korist od praćenja DNK-nemije se ogleda u mogućnosti verifikacije skoka parazitemije kod rezistencije na antimalarike.

U toku primene antimalarika mikroskopski se ne mogu razlikovati terapijom oštećeni i neoštećeni paraziti, što je jedna od mana mikroskopije jer vodi prolongiranoj, bespotrebnoj primeni antimalarika. U tom smislu, detekcija prolongirane DNK-nemije, takođe ne doprinosi rešenju ovog problema. U tim situacijama klinički bi bio koristan brzi antigenski test za detekciju pLDH koju luče samo vijabilni paraziti, ali tu postoji problem nedovoljne osetljivosti ovih testova za nefalciparumske vrste i za niske parazitemije (74, 75, 76).

Duža detektabilnost DNK merene qPCR-om u odnosu na parazitemiju merenu mikroskopski posledica je i veće osetljivosti qPCR-a za niske parazitemije. Ovo je pokazano detekcijom DNK *P. falciparum* kod tri bolesnika koji su samoinicijativno započeli terapiju. Stoga je klinički opravdano kod ove kategorije bolesnika i drugih nejasnih slučajeva primeniti qPCR. Dobra osetljivost preporučuje ga i za dijagnostički skrining kod asimptomatskih povratnika iz tropskih krajeva, naročito kod imunizovanih osoba koje tamo žive ili su dugo boravile.

Prolongirana parazitemija može biti i posledica rezistencije na antimalarike. Studije u JI Aziji sugerišu da neki bolesnici ispoljavaju produženo vreme parazitskog klirensa na 3 dana nakon monoterapije artesunatom (161). Trajanje parazitemije je duže nakon terapije kininom nego hlorokvinom (55).

Dosadašnja ispitivanja pokazala su duže trajanje DNK-nemije nego mikroskopske parazitemije (146, 162, 163). Prvobitna tumačenja bila su da detekcija DNK parazita 5 do 8 dana nakon uvođenja antimalarika ukazuje na terapijski neuspeh, kao posledica parazitskog otpora (164). Ova "upornost" DNK plazmodijuma je međutim manja od "upornosti" održavanja HRP2 antigenemije koja se beleži brzim testovima (77, 94). Komparacija dijagnostičkih metoda (dva brza testa sa HRP2 antigenom i pLDH, mikroskopija nakon bojenja po Gimzi i akridin oranžom i qPCR) u praćenju efikasnosti primenjene terapije kod 53 tanzanijske dece sa nekomplikovanom *falciparum* malarijom lečene kombinacijom artemetar - lumefantrin pokazala je da je praćenje pLDH antigenemije superiorno za procenu ishoda lečenja. Zabeleženo je srednje vreme trajanja HRP2 antigenemije od 28 dana (u rasponu 7 do > 42 dana), 7 dana za pLDH (2 - 14 dana), srednje trajanje parazitemije mikroskopijom preparata bojenih po Gimzi i akridin-oranžom bilo je po 2 dana dok je srednje vreme DNK-nemije qPCR-om bilo 3 dana (1 - 28). Od četvero dece sa prolongiranom parazitemijom (u trajanju od 7, 14 a kod dvoje 21 dan), dvoje je imalo samo gametocite. Kod 10 dece došlo je do pojave rekrudescencije unutar 42 dana koliko su praćeni nakon prve epizode bolesti. Rekrudescencija se javljala između 14. i 35. dana praćenja, i najuspešnije je detektovana brzim testom sa pLDH (8/10). qPCR je u vreme rekrudescencije bio pozitivan kod svih 10 bolesnika ali i kod dodatnih šest asimptomatskih bolesnika usled prolongirane DNK-nemije (75).

Istraživanja su pokazala i mogućnost hronične detekcije parazitske DNK u regionima sveta gde je malarija endemska, što može biti posledica veoma niskih parazitemija imunizovanih pojedinaca (165, 80). Osobe koje žive u područjima endemskim za malariju kontinuirano su izložene infekciji, tako da nakon ponovljenih infekcija mogu razviti stanje premunicije koje se karakteriše imunskim odgovorom sposobnim da kontroliše parazitemiju. Ovaj imunitet međutim ne može da eliminiše sve parazite iz cirkulacije, tako da ove osobe postaju asimptomatski rezervoari i omogućavaju zaražavanje vektora i održavanje transmisije (166, 167). Ako ovakve osobe dođu u područja gde malarije nema, predstavljaju opasnost i za uspostavljanje transmisije u ovim regionima ukoliko domaći vektori preuzmu gametocite krvnim obrokom, kao i rizik za zdravstvene radnike (ubod kontaminiranom iglom), za prenošenja infekcije transfuzijom krvi, kongenitalno ili transplantacijom organa. Stoga

je preporuka da se imigranti iz endemskih područja podvrgnu skriningu na malariju (168). U Italiji se od 2000. godine beleži stalan pad broja importovanih slučajeva malarije preko imigranata, ali oni su još uvek sa 70% najzastupljenija kategorija obolelih od malarije. Podaci Mascarello i sar. (2008) potvrđuju značajnu razliku kako u kliničkim tako i u parazitološkim nalazima između delimično imunizovanih i neimunizovanih bolesnika. Tri glavne bolnice u Veroni (koje zbrinjavaju 10% svih slučajeva importovane malarije u Italiji) prijavile su od 2000. do 2004. godine 380 slučajeva malarije, uključujući 43 dece. Delimično imunizovani bolesnici imali su značajno nižu parazitemiju i kraće vreme parazitskog klirensa i značajno kraće trajanje febrilnosti od neimunizovanih, koji predstavljaju grupu visokog rizika za razvoj teške malarije. Kod imigranata dečijeg uzrasta je zabeležena znatno viša parazitemija i značajno manji broj trombocita nego kod odraslih imigranata (169). Driessen i sar. (2008) u Holandiji navode bolesnike dečjeg uzrasta kao posebno rizičnu kategoriju za importovanu malariju, kod kojih su u 31% slučajeva zabeležili komplikacije (170). U našem istraživanju u analiziranom periodu nismo zabeležili slučajeve importovane malarije kod dece ali ranije jesu beleženi takvi slučajevi (30).

Prevalencija malarije među izbeglicama iz endemskih područja kreće se od 3% do preko 60%, a mnogi od njih su bez kliničkih tegoba (171). Studija sprovedena u Kanadi, u kojoj su ispitivane 324 asimptomatske izbeglice iz malaričnih područja na prisustvo plazmodijuma PCR-om, pokazala je prevalenciju od 3,1% što ukazuje na značaj molekularnog skrininga u prevenciji simptomatske infekcije ali i u prevenciji uspostavljanja autohtone transmisije (116).

Ima i suprotnih mišljenja; studija u Iranu kojom je obuhvaćeno 900 asimptomatske dece školskog uzrasta sa područja sa endemskom malarijom pokazala je odsustvo pozitivnih nalaza mikroskopijom i 1,1% pozitivnih nalaza na *P. vivax* PCR-om a zaključak autora je da nema opravdanosti za primenu skupe metode poput PCR-a kod asimptomatske populacije (172).

U našem istraživanju, kod tri bolesnika sa *P. falciparum* malarijom i jednog sa *P. vivax*-om zabeležen je skok DNK-nemije drugog dana po započinjanju terapije antimalaricima. Kod dva bolesnika sa *P. falciparum* malarijom usledio je i skok mikroskopske parazitemije, međutim ova promena nije korelirala sa kliničkim

pogoršanjem niti sa promenama u hematološko-biohemijskim nalazima tako da terapijski protokol nije korigovan.

Početne varijacije u parazitemiji nakon započinjanja terapije antimalaricima mogu biti fiziološke. Kod *P. falciparum*, šizonti se retko nalaze u perifernoj krvi jer su zaplenjeni na endotelu sitnih krvnih sudova unutrašnjih organa. Pad parazitemije može biti posledica sekvestracije, i tada se u krvi uočavaju zreli trofozoiti. S druge strane, prskanjem zaplenjenih šizonata, može doći do skoka parazitemije znatno izraženijeg nego kod drugih vrsta gde nema zaplene parazitiranih Er. Tada u krvi dominiraju mladi trofozoiti (123). Time se može objasniti skok parazitemije kod dva bolesnika sa *P. falciparum* malarijom.

Vreme mikroskopskog klirensa parazita u toku lečenja nekomplikovane *falciparum* malarije artemizininim preparatima je obično 72 sata (161). Poznato je da je klirens parazitemije kininom sporiji (47). Interesantni su rezultati PCR istraživanja o održavanju DNK-nemije na animalnom modelu, miševima eksperimentalno inficiranim sa *P. chabaudi chabaudi*. Prvoj grupi su direktno u krvotok ubrizgavani plazmodijumi ubijeni postupkom zamrzavanja - otopljanja, dok su druga i treća grupa inficirane vijabilnim parazitima nakon čega je druga grupa lečena, a kod treće, hiperimunizovane grupe parazitemija je eliminisana imunskim mehanizmima. U prvoj grupi nakon inokulacije nevijabilnih parazita DNK se nije mogla detektovati posle 48 sati. Rezultat ove grupe pomogao je da se uočena prolongirana amplifikacija DNK nakon klirensa vijabilnih parazita u drugoj grupi objasni prisustvom DNK iz lekovima nedavno uništenih ili oštećenih parazita (132).

Skrining qPCR može se koristiti za kvantifikaciju parazita. Međutim, u našem radu pokazana je niska korelacija ( $r=-0,442$ ,  $p=0,009$ ,  $r^2=0,195$ ) između  $C_T$  vrednosti dobijene na skrining qPCR-u i mikroskopski određenih nivoa parazitemije za *P. falciparum* infekcije. U studiji Dormond-a i sar. (2011) korelacija parazitemije određene skrining qPCR-om i mikroskopski bila je visoka ( $r^2$  vrednost 0,577) (90), dok su Rosanas-Urgell i sar. (2010) zabeležili  $r^2$  vrednost od 0,825 za *P. falciparum*, odnosno 0,5049 za *P. vivax*, što objašnjavaju generalno nižom parazitemijom kod ove vrste (173).

Niska korelacija u našoj studiji može se objasniti činjenicom da je standardna kriva za kvantifikaciju dobijena iz uzorka sa parazitomijom koja je ograničena subjektivnošću parazitologa. Dalje, nižem nivou korelacije u našoj studiji mogli su doprineti i prisustvo više parazita u Er (što je uobičajeno kod vrste *P. falciparum* koji je u našoj studiji bio dominantan, a što se zanemaruje pri izračunavanju parazitomije), prisustvo gametocita čija DNK se takođe detektuje qPCR-om a ne računa se pri izračunavanju parazitomije, kao i prolongirano prisustvo DNK kod lečenih bolesnika. Merenjem DNK-nemije, dakle, kod *P. falciparum* infekcije mogu se zabeležiti lažne visoko pozitivne vrednosti, što neizbežno ukazuje na potrebu za daljom standardizacijom i optimizacijom protokola za kvantifikaciju parazita qPCR-om. Ono što preporučuje kvantifikaciju parazitomije PCR-om su brojni nedostaci mikroskopskog izračunavanja parazitomije. Procena je da debeo krvni razmaz snižava parazitomiju za 30% u odnosu na tanak krvni razmaz. Zato je korisno automatsko brojanje ili kvantifikacija qPCR-om (123).

U podgrupi bolesnika sa *P. falciparum* malarijom kod kojih je parazitomija praćena u toku i nakon antimalarične terapije, naglo je opadala prvog dana primene terapije. Parazitomija nije bila detektabilna nakon drugog dana kod četiri bolesnika, odnosno trećeg dana terapije kod dva bolesnika. Međutim, parazitska DNK je detektovana mnogo duže (16, 18 pa i 27 dana). Srednja  $C_T$  vrednost za šest bolesnika prvog dana mikroskopski nedetektabilne parazitomije bila je  $32,07 \pm 1,28$ , a kretala se u rasponu od 28,08 do 35,35. Jedan bolesnik je bio samoinicijativno započeo terapiju (*Coartem*®) pre javljanja na pregled, ali je interesantno da nije bilo razlika između njega i ostalih bolesnika. Dormond i sar. (2011) su praćenjem 82 slučajeva malarije mikroskopski i skrining qPCR-om zabeležili brzo opadanje parazitske gustine sa započinjanjem terapije, sa sličnim padom obe krive, i parazitomije i DNK-nemije, odnosno visoku korelaciju kvantifikacije parazita merene qPCR-om i mikroskopijom, što ukazuje na upotrebljivost obe metode za praćenje efikasnosti primenjene terapije (90).

Kod 45 bolesnika sa dokazanom malarijom dominirao je muški pol (95,6%). Srednja životna dob iznosila je 50 godina. Uzimajući u obzir da je višemesečno angažovanje na građevinskim poslovima bio glavni razlog putovanja, dominantno je

bilo zastupljeno radno sposobno stanovništvo (> 20 godina), muškog pola. Većinu bolesnika činili su državljani Srbije. Posao kao glavni razlog putovanja predstavlja višedecenijsku karakteristiku importovane malarije u Srbiji, i dok je ranije veliki broj naših građevinskih firmi sklapao poslove sa afričkim nesvrstanim zemljama (20), u poslednjim decenijama u vreme tranzicije, došlo je do propadanja velikih građevinskih preduzeća i radnici su u potrazi za poslom pojedinačno, manje ili više organizovano, odlazili u afričke zemlje (30). Većinom se radilo o poslovima na izgradnji puteva i stambenih objekata (80,0%). U Hrvatskoj dominiraju pomorci, potom građevinski radnici i turisti (174), dok u zapadnoevropskim zemljama dominiraju imigranti a domaće stanovništvo stiže malariju na turističkim putovanjima (66, 118, 119, 120, 169).

Najveći broj bolesnika sa malarijom je boravio duže od 6 meseci u endemskim područjima za malariju (82,2%). Antimalaričnu profilaksu, i to neredovno, koristilo je svega 4,4% bolesnika. Ranije epizode malarije imalo je 86,7% bolesnika, što je posledica dugog boravka u malaričnom području i nekorišćenja profilakse. U Sloveniji, među 73 bolesnika sa malarijom 17,8% imalo je ranije epizode malarije (144). U Hrvatskoj je od 201 slučaja importovane malarije u periodu 1987 - 2006. redovnu profilaksu koristilo 23,3% obolelih (174), dok je u Sloveniji u periodu od 2001 - 2011. od 73 slučaja importovane malarije podatak o pravilnom režimu korišćenja hemioprofilakse dalo 21,9% obolelih (144). Iako kod nas ne postoje registrovani antimalarici, putnici dobijaju preporuke od epidemiologa Instituta za javno zdravlje Srbije o odgovarajućem antimalariku za područje u koje putuju, kao i režim upotrebe. Slabo korišćenje profilakse je kako posledica realnog straha od štetnih efekata tako i predrasuda o antimalaricima u smislu njihovog efekta na smanjenje potencije i pojavu psihičkih smetnji. Interesantno je da putnici retko daju podatak o korišćenju alternativnih profilaktičkih preparata koje spravlja lokalno stanovništvo.

Afrika je bila najposećeniji kontinent, i to najviše centralna i zapadna Afrika, što je trend i u drugim zemljama zapadnog Balkana (143, 144, 145) ali i zapadne Evrope. U Velikoj Britaniji npr zapaženo je da je od 773 bolesnika sa laboratorijski potvrđenom *P. falciparum* malarijom 96% putovalo u Afriku a dominantan razlog putovanja bila je poseta rođacima u zemlji porekla, dok je prosečno vreme od pojave simptoma do javljanja na pregled bilo četiri dana (118).

Gotovo polovina obolelih od malarije (46,7%) boravila je u E. Gvineji, zatim Nigeriji i Angoli, što je posledica migracije naših građevinskih radnika od 2010. godine u ova područja. U Kini se najveći broj slučajeva malarije importuje preko radnika koji rade u Angoli, Nigeriji i E. Gvineji (175). E. Gvineja je zemlja u kojoj je transmisija malarije među najintenzivnijim u svetu (48, 176). Zbog priliva imigranata iz E. Gvineje kao bivše španske kolonije, dominantno importovanje malarije iz ove zemlje zapaža se i u Španiji (177), u Madridu čak 81,7% (66). U Barseloni je gotovo 60% afričkih bolesnika sa malarijom poreklom iz ove zemlje (178). I zemlje u našem okruženju poput Albanije (143) i Rumunije (179) beleže importovanje malarije preko svojih državljana koji rade u E. Gvineji. Ovo je posledica ekspanzije građevinskih radova i izgradnje puteva u ovoj zemlji i potražnje za radnom snagom koja se preliva iz zemalja u tranziciji. Važno je primetiti da su u našu zemlju iz E. Gvineje importovane sve četiri vrste plazmodijuma, najviše *P. falciparum* (n=13).

U našoj studiji dijagnostikovani su samo bolesnici sa importovanom malarijom. Klinička slika u prilog ove infekcije međutim i bez podatka o putovanju u malarično područje obavezuje na isključivanje ove infekcije, zbog mogućnosti uspostavljanja sporadičnih slučajeva autohtone transmisije (2, 3, 5, 180).

Svih 45 bolesnika sa potvrđenom malarijom je imalo karakterističnu kliničku sliku ove bolesti. Kod 6,7% bolesnika tegobe su započele pre povratka u zemlju, dok su kod najvećeg broja bolesnika započele u toku prve (40,0%) i druge nedelje (22,2%) po dolasku u zemlju. Kod osam bolesnika tegobe su započele između 2 meseca i godinu dana po povratku, i u svim slučajevima se radilo o ne-*falciparum* malariji. Srednje vreme javljanja tegoba po dolasku u zemlju kod bolesnika sa dijagnostikovanom *P. falciparum* infekcijom bilo je 7,8 dana (najduže 30 dana). Generalno se ova vrsta klinički ispoljava unutar prva 2 meseca po infekciji, vrlo retko kasnije (37). Srednje vreme javljanja tegoba nakon povratka u zemlju za *P. vivax* bilo je 61 dan, kod *P. ovale* 165 i kod *P. malariae* 42,7 dana.

Srednje vreme od pojave tegoba do javljanja na pregled za obolele od malarije bilo je 4,8 dana što je slično studiji Roberts i sar. (2013) koji su zabeležili 4 dana (118).

Samoinicijativno započinjanje terapije antimalaricima je značajno zastupljenije u kategoriji bolesnika sa malarijom nego u grupi bez malarije ( $P=0,004$ ). U grupi sa



dijagnostikovanom malarijom gotovo trećina bolesnika je u vreme javljanja na pregled započela terapiju antimalaricima što zbog redukovanja parazitemije i prisustva poluraspadnutih parazita značajno otežava mikroskopsku dijagnostiku. Pojava samolečenja već duže vreme je prisutna među našim građevinskim radnicima koji neorganizovano odlaze u malarična područja, gde od tamošnjih poslodavaca dobijaju antimalarike sa preporukom da ih pri pojavi febrilnosti upotrebe (30), ali se ova pojava beleži i u razvijenim zemljama poput Japana. PCR se smatra pogodnom metodom za ovu kategoriju mikroskopski nedetektabilnih malarija (181).

Hronične bolesti zabeležili smo kod 26,7% bolesnika sa malarijom. U studiji u Madridu kod 293 slučaja importovane malarije, komorbiditet, uglavnom sa drugim infektivnim bolestima, zabeležen je kod 60,4% bolesnika (66).

Za razliku od npr protokola u Švajcarskoj i Sloveniji (121, 144) gde se ne hospitalizuju svi oboleli od malarije, kod nas se svi bolesnici sa malarijom hospitalno leče. Hospitalizacija je trajala prosečno 12 (najduže 85) dana, za razliku od Slovenije gde je prosečno trajanje hospitalizacije svega 3 dana (144).

U našem istraživanju su svi bolesnici sa malarijom bili febrilni dok Ramírez-Olivencia i sar. (2012) u Madridu beleže i pojavu asimptomatske mikroskopske malarije (11,1%). Isti autori u kategoriji bolesnika sa mikroskopski dokazanom malarijom beleže 95,2% febrilnosti i svega 60% u kategoriji SMM (66) što je posledica veće zastupljenosti imunizovanih bolesnika. Jezu i drhtavicu imalo je 93,3% bolesnika, a glavobolju 46,7% bolesnika prema 70,8% kod mikroskopske malarije koliko beleže autori u Madridu (66).

U kompleksnoj dijagnostici malarije značajno mesto zauzimaju tzv. surogat markeri, tj. biohemijski i hematološki parametri koji mogu olakšati sumnju na ovu infekciju i ubrzati potvrdu dijagnoze. Anemija i trombocitopenija su najučestaliji hematološki parametri udruženi sa malarijom, kako onom izazvanom sa *P. falciparum* tako i sa *P. vivax*. Kod neimunizovanih putnika razvoj i intenzitet anemije i trombocitopenije zavisi od vrste roda *Plasmodium*, vremena proteklog od infekcije, intenziteta infekcije i imunskog statusa domaćina (182). Trombocitopenija se smatra dobrim prediktorom akutne malarije i kod odraslih (121, 183, 184) i kod dece (185). Obično je blaga do umerena, ali može biti i teška.



U hematološkim nalazima kod 62,2% bolesnika zabeležen je pad Er, kod 35,6% pad Hgb, dok je kod 88,9% zabeležena trombocitopenija. Porast LDH imalo je 77,8% bolesnika. Pokazana je statistički značajna razlika u pojavljivanju hemoglobinemije, eritrocitopenije, leukocitopenije i pada LDH u kategoriji bolesnika sa dokazanom malarijom nasuprot kategoriji bolesnika kod kojih je malarija isključena, dok je najviša razlika pokazana za pojavu trombocitopenije.

U opsežnoj studiji sprovedenoj u Njujorku od strane Patel-a i sar. (2004) trombocitopenija je zajedno sa febrilnošću imala osetljivost i NPV 100%, specifičnost 70% i PPV 86%. Stoga je preporučeno da kod febrilnih bolesnika sa trombocitopenijom i podatkom o putovanju u malarično područje treba obavezno izvršiti višekratno ispitivanje na malariju (184). Mehanizmi koji dovode do trombocitopenije kod malarije još uvek nisu poznati, ali su povezani sa težinom bolesti (186). Analizom korelacije nivoa parazitemije i Tr uočena je značajnija trombocitopenija kod bolesnika koji imaju hiperparazitemiju i akutnu bubrežnu insuficijenciju u odnosu na bolesnike bez komplikacija (187).

Gjørup i sar. (2007) u Danskoj analizirali su hematološke i biohemijske parametre kod 28 bolesnika sa *P. falciparum* i 12 sa *P. vivax/ovale* malarijom i 66 bolesnika suspektnih na malariju bez mikroskopske potvrde. Trombociti, Le kao i faktori koagulacije (II-VII-X) bili su značajno niži, a C-reaktivni protein (CRP), LDH i bilirubin značajno viši u kategoriji bolesnika sa potvrđenom malarijom, bez značajnih promena u nivou Hgb (183).

Rutinski laboratorijski nalazi ne koreliraju uvek sa težinom malarije. Stauga i sar. (2013) analizirali su dijagnostičku i prognostičku vrednost nekoliko biomarkera zapaljenja, endotelne i srčane disfunkcije, koagulacije (fibrinogen, D-dimer, Tr) i hemolize (LDH) kod 12 bolesnika sa teškom i 67 sa nekomplikovanom importovanom *falciparum* malarijom, upoređujući ih sa rezultatima 41 negativne kontrole u Nemačkoj. Najbolji dijagnostički marker u prilog malarije bio je porast nivoa CRP-a preko 10,8 mg/L, dok nijedan biomarker ni na prijemu ni u toku hospitalizacije nije bio od prognostičkog značaja za razvoj teške malarije (188).

D'Acremont i sar. (2002) u Švajcarskoj na uzorku od 97 bolesnika sa malarijom i 239 kontrola apostrofiraju splenomegaliju i trombocitopeniju kao najbolje prediktore

malarije korisne kao smernice za započinjanje terapije kod bolesnika sa negativnom mikroskopijom ili nemogućnošću sprovođenja hitne dijagnostike (6).

Od 45 bolesnika sa dijagnostikovanom malarijom kod 38 (84,4%) bolesnika radilo se o inicijalnoj infekciji. Kod ostalih sedam u pitanju su bili relaps (n=3) i rekrudescencija (n=4). Relapsi su se javljali u rasponu i do 6 meseci od lečenja inicijalne infekcije a rekrudescencije do 20. dana od lečenja inicijalne *falciparum* malarije. Sem jednog bolesnika kod koga je relaps bio posledica dijagnostičke greške u pogledu vrste kada je proglašen *P. malariae* umesto *P. ovale*, što je uslovalo nedavanje primakvina, ostali su bili posledica neadekvatnog lečenja malarije neposredno pre dolaska u Srbiju ili prethodnog samoinicijativnog lečenja malarije nakon povratka u zemlju. U Sloveniji su u toku poslednje decenije od 73 bolesnika kod tri zabeleženi relapsi malarije, jedan *P. ovale* i dva *P. vivax*, i nije zabeležen nijedan smrtni ishod (144), dok je u Hrvatskoj zabeležen jedan smrtni ishod (174).

Komplikovana malarija definisana je prema kriterijumima SZO, koji uključuju akutnu renalnu insuficijenciju (serumski kreatinin > 2,5 mg/dL), hiperparazitemiju (> 5%), tešku anemiju (hemoglobinemija < 80 g/L) i neurološke simptome (poremećaj svesti, koma ili konvulzije) (45). Mi smo zabeležili šest slučajeva teške *P. falciparum* malarije (13,3% od svih slučajeva malarije, odnosno 18,8% slučajeva *P. falciparum* infekcije). Među njima, došlo je do jednog letalnog ishoda, i to kod bolesnika koji je razvio bubrežnu insuficijenciju i cerebralnu malariju, što čini 2,2% od svih obolelih od malarije, odnosno 3,1% od obolelih od *P. falciparum* malarije. Kod ostalih bolesnika komplikacije su uspešno terapijski razrešene. Teška malarija nije uvek korelirala sa nivoom parazitemije. U studiji u Madridu, kod obolelih sa mikroskopskom potvrdom malarije tešku malariju imalo je 6,9% obolelih a nijedan u kategoriji SMM (66).

Klinička studija u JI Aziji je pokazala da u lečenju teške malarije, intravenski primenjen artesunat brže dovodi do klirensa parazita, bolje se toleriše i sigurniji je i jednostavniji za primenu a beleži se i manji mortalitet nego sa intravenskom primenom kinina (15% prema 22% kod primalaca kinina). Otuda autori i preporučuju artesunat kao lek izbora za teške *falciparum* malarije kod odraslih (47).

U poslednje dve decenije pojavljuju se sporadični slučajevi autohtone malarije i u zemljama u Evropi u kojima je ova bolest eradikovana. Tako je 1997. godine zabeležen jedan autohtoni slučaj *P. vivax* malarije u Italiji (189). U Bugarskoj (blizu granice sa Grčkom i Makedonijom) je tokom 1995. i 1996. godine registrovano 18 slučajeva *P. vivax*, ali je brзом intervencijom lokalizovano širenje malarije (190). U Francuskoj je, na Korzici 2006. godine zabeležen slučaj autohtone *P. vivax* malarije, a u Marseju i *falciparum* malarije (2, 180). I u Španiji je 2010. godine, u regionu Aragon gde su prisutni vektori *A. atroparvus*, zabeležen slučaj autohtone *P. vivax* malarije (5). Do uspostavljanja autohtone transmisije dolazilo je kada su domaći vektori u letnjem periodu preuzeli gametocite od prisutnih imigranata, izbeglica ili turista iz malaričnih područja, i nakon sporogonije pri uzimanju sledećeg krvnog obroka inficirali narednog domaćina. Brzim multidisciplinarnim pristupom ovi slučajevi su brzo lokalizovani. Međutim, u Grčkoj je došlo do širenja autohtone *P. vivax* malarije (3). Sporadični, lokalizovani slučajevi autohtone transmisije malarije (*P. falciparum*, *P. malariae* i dva *P. vivax*) kod domaćeg stanovništva zabeleženi su 1994/1995. godine u Evros provinciji, a zatim su se i 1998. u istom području pojavila još dva slučaja *P. vivax* malarije (191). Od 2009. godine međutim dolazi do epidemije autohtone *P. vivax* malarije (192). U Rumuniji je 2011. godine dijagnostikovana *P. vivax* malarija rumunskog državljanina nakon boravka u Grčkoj (193).

Mikroskopski nedetektabilna importovana malarija takođe predstavlja rizik za uspostavljanje autohtone malarije (66). U našoj zemlji ne postoji zakonska obaveza za skrining na malariju kod imigranata i izbeglica iz malaričnih i potencijalno malaričnih područja. Slična je situacija i u Sloveniji gde se međutim nakon pet dijagnostikovanih slučajeva importovane malarije u kategoriji imigranata i jednog slučaja kod izbeglice ovaj problem aktuelizuje (144). Podaci o boravku više hiljada imigranata u Srbiji, uključujući i zemlje gde ima *vivax* malarije poput Avganistana i Pakistana, upućuje na potrebu preventivnog dijagnostičkog nadzora nad ovom kategorijom. Pravovremen dijagnostički nadzor kako nad simptomatskim tako i nad asimptomatskim povratnicima iz endemskih područja predstavlja nezaobilaznu kariku u lancu prevencije uspostavljanja autohtone transmisije malarije. U skladu sa rezultatima ovog rada, koji su pokazali odličnu osetljivost skrining qPCR-a, predlaže se redefinisavanje dijagnostičkog algoritma za importovanu malariju u Srbiji. Svršishodno bi bilo da se za skrining

asimptomatskih povratnika u cilju isključenja nosilaštva gametocita plazmodijuma odgovornih za uspostavljanje transmisije uvede jednokratna primena skrining qPCR koji bi se obavljao paralelno sa mikroskopijom.

Primena qPCR-a je doprinela i realnijem sagledavanju vulnerabilnosti koja čini važan element za procenu malariogenog potencijala. Od 45 bolesnika sa malarijom 24,4% su bili nosioci gametocita, većinom u umerenom broju. Gametonoštvo je trajalo između 2 i 14 dana. Kod *P. falciparum* infekcija bilo je 12,5% gametonoša, kod *P. vivax* 50%, kod *P. ovale* 66,7% i kod *P. malariae* 33,3%. Sem jednog gametonoštva *P. vivax* poreklom iz Azije, ostali su importovani iz Afrike. Gametonoštvo je uočeno tokom letnjih meseci kod pet bolesnika i to četiri kod vrste *P. falciparum* a kod jednog *P. malariae*. Bolesnici su dominantno lečeni artemizininskim preparatima za koje je pokazano da redukuju transmisioni potencijal gametocita (32, 56, 194, 195). Bolesnici su lečeni u bolnici u centru grada, gde je ograničen kontakt *Anopheles* komaraca i čoveka. Iako se naše područje zbog ranijeg prisustva vektora malarije (196) smatra receptivnim, zbog prisustva retkih nosilaca gametocita tokom letnjih meseci, pri čemu nijedan nosilac gametocita u letnjem periodu nije bio nosilac gametocita *P. vivax* za koji su evropske vrste anofeličnih komaraca pogodni vektori (197), vulnerabilnost je niska.

U akutnoj *P. falciparum* infekciji gametociti nastaju 7 do 15 dana nakon parazitemije i prisutni su prosečno tokom 6,4 dana (raspon 2,5 - 22 dana) (78). U jednom istraživanju u Velikoj Britaniji, od 773 bolesnika sa laboratorijski potvrđenom *P. falciparum* malarijom, 25% imalo je gametocite, i to 12% na prijemu a kod ostalih 13% gametociti su nađeni u toku primene terapije ali nije uočena povezanost sa terapijskim protokolom (118).

Opsežnim istraživanjima gametonoštva vrste *P. vivax*, na Tajlandu i u Indoneziji, Douglas i sar. (2013) su našli značajno prisustvo gametocita zajedno sa aseksualnim stadijumima u toku lečenja, i to kod 84,3% od 492 bolesnika sa *P. vivax* infekcijom na Tajlandu i kod 66,6% od 314 bolesnika sa ovom monoinfekcijom i kod 56,8% od 162 bolesnika sa mešanom infekcijom sa *P. falciparum* u Indoneziji. Na obe lokacije nađeno je da viša parazitemija aseksualnih stadijuma parazita povećava rizik za pojavu gametocita, dok je pokazana ujednačena zastupljenost gametocita u akutnim infekcijama i u relapima kao i sinhrono iščezavanje gametocita i aseksualnih stadijuma parazita tokom terapije (31).

DNK-nemija kod 11 bolesnika sa gametocitima trajala je prosečno 9,6 dana, dok je DNK-nemija kod 34 bolesnika bez mikroskopski uočenih gametocita trajala 7,4 dana. U odnosu na *Plasmodium* spp., samo je za *P. falciparum* pokazana statistički značajna razlika u trajanju DNK-nemije između nosilaca gametocita (17,5 dana) i bolesnika bez gametocita (8,0 dana).

Novija molekularna istraživanja usmerena su ka razdvajanju detekcije nukleinskih kiselina aseksualnih i seksualnih stadijuma parazita (33, 198).

U našoj zemlji se zahvaljujući dobrom sistemu epidemiološkog nadzora i male mogućnosti kontakta vektora i nosilaca gametocita koji se brzo dijagnostikuju i efikasno leče, ne očekuju epidemije malarije. Ne može se, međutim, isključiti mogućnost sporadičnog pojavljivanja autohtone, urbane malarije u neobičnim okolnostima (199). Ovome pogoduju globalno zagrevanje, kao i sociopolitički i ekološki faktori, koji mogu za posledicu imati izmene u gustini i distribuciji vektora malarije (12). Ilustrativna je 1999. godina, kada su na teritoriji Beograda intenzivne kiše tokom jula i toplo vreme sa elementima tropske klime zbog nemogućnosti sistematskog tretmana komaraca na širem području grada (zbog NATO bombardovanja), rezultirale znatnim povećanjem broja komaraca. Primer neobičnih okolnosti su i enormne poplave zabeležene tokom maja 2014. godine, kada se zbog visokih temperatura stvara tropski mikroklimat koji pogoduje razmnožavanju svih komaraca uključujući i potencijalne vektore malarije.

Na kraju, potrebno je osvrnuti se i na ograničenja ovog istraživanja. Neka su tehničke prirode i njihovo izbegavanje bi zahtevalo ulaganje većih materijalnih resursa, kao što je, npr, primena prajmera za detekciju *P. ovale* kojima se nisu mogle detektovati obe podvrste. Jedno ograničenje koje nije moguće izbeći jeste subjektivnost parazitologa prilikom mikroskopskog određivanja nivoa parazitemije ne samo u ispitivanim već i u kontrolnim uzorcima, ali ovo je standardno ograničenje mikroskopije kao dijagnostičke metode pa i svih na njoj zasnovanih istraživanja. U nekim studijama u postupku određivanja osetljivosti qPCR-a kao i za pravljenje standardne krive za kvantifikaciju korišćena je DNK plazmodijuma iz parazitske kulture, dakle slobodna od humane DNK (91), da bi se izbegla inhibicija PCR-a u višku humane DNK (87, 114, 200). Neophodno je stalno praćenje novih naučnih otkrića u ovoj oblasti i konstantno nadograđivanje protokola za rutinsko izvođenje qPCR-a u dijagnostici malarije.

S druge strane, veliku prednost našeg istraživanja predstavlja uključivanje svih bolesnika sa sumnjom na malariju u ispitivanom vremenskom periodu. Zatim, uzorci krvi su sukcesivno sakupljeni u toku primene terapije čime je omogućeno praćenje dinamike DNK plazmodijuma. Protokol primenjen u ovoj studiji imao je visoku analitičku osetljivost koja je pokazala nadmoćnost skrining qPCR-a nad mikroskopijom kod niskih parazitemija naročito u kategoriji bolesnika koji su samoinicijativno započeli terapiju antimalaricima pre dijagnostike. Kada se ovome doda pouzdanije određivanje vrste plazmodijuma specijes-specifičnim qPCR-om nego mikroskopijom proizilazi zaključak da je potrebno da referentne ustanove u zemlji imaju mogućnost da primene i skrining i specijes-specifični qPCR za dijagnostiku importovane malarije. Iako čitav postupak molekularne dijagnostike traje 3 i više sati njegova primena zajedno sa konvencionalnom dijagnostikom sasvim je opravdana jer bi se u roku od 24 sata obezbedila pouzdana identifikacija vrste plazmodijuma.

***ZAKLJUČAK***

## 6. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata opsežnog istraživanja kojim je dijagnostički značaj molekularne dijagnostike evaluiran u odnosu na konvencionalnu dijagnostiku malarije na uzorku od 109 bolesnika (322 uzorka) sa sumnjom na importovanu malariju, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Malarija je dijagnostikovana kod 45 bolesnika, od kojih je kod 42 potvrđena mikroskopski. Kod preostala tri bolesnika dijagnoza je indirektno potvrđena adekvatnim terapijskim odgovorom, a naknadno i na osnovu primene molekularne dijagnostike.
2. Kombinovana primena skrining i specijes-specifičnog qPCR-a uspešno je standardizovana za dijagnostiku malarije. Postignuta je odlična analitička osetljivost i specifičnost obe metode. Za skrining qPCR analitička osetljivost bila je 0,04 par/ $\mu$ L, a specifičnost 100%. Analitička osetljivost za specijes-specifični qPCR bila je 6 par/ $\mu$ L za *P. falciparum*, 0,3 par/ $\mu$ L za *P. vivax*, 0,13 par/ $\mu$ L za *P. ovale* i za *P. malariae* 0,09 par/ $\mu$ L. U kontrolnoj grupi nije bilo lažno pozitivnih rezultata.
3. Rezultati su pokazali da je qPCR pouzdaniji od mikroskopije u slučaju niske parazitemije, što je naročito važno u brojnoj kategoriji bolesnika (28,3%) koji su samoinicijativno započeli terapiju antimalaricima pre dijagnostike.
4. Prednost specijes-specifičnog qPCR-a nad mikroskopijom je i veća pouzdanost za određivanje vrste roda *Plasmodium*. Podudaranje mikroskopije i specijes-specifičnog qPCR-a zapaženo je kod 73,3% bolesnika sa malarijom. U slučajevima u kojima se rezultati nisu slagali, kod 75% je pokazana prednost specijes-specifičnog qPCR-a dok je u ostalih 25% prednost bila na strani mikroskopije iz tehničkih razloga.
5. Najbolje poklapanje između mikroskopije i specijes-specifičnog qPCR-a kod bolesnika sa malarijom pokazano je za *P. falciparum* i iznosilo je 90,6%.
6. Primenom specijes-specifičnog qPCR-a pokazano je značajno veće učešće *P. ovale* u ukupnoj populaciji *Plasmodium* spp. u ispitivanoj populaciji bolesnika (13,3%) nego što je to ranije bilo otkriveno primenom samo konvencionalnih dijagnostičkih metoda (1%).



7. Dugo održavanje DNK-nemije u toku i nakon lečenja malarije, zbog visoke osetljivosti qPCR-a, predstavlja ograničenje ove metode za svrhu praćenja efekta terapije.

8. Zbog dužine izvođenja (u odnosu na mikroskopiju), qPCR se ne preporučuje kao jedini test za inicijalnu dijagnostiku malarije, ali predstavlja značajni potvrđni test, dok može biti i test izbora u slučaju niske parazitemije, kao i za determinaciju vrsta, naročito nefalciparumskih vrsta *Plasmodium* spp.

Stoga je glavni zaključak ovog istraživanja da je u ovom trenutku **najbolji dijagnostički pristup kombinacija konvencionalne dijagnostike i qPCR-a**. Naravno, u cilju otklanjanja sadašnjih ograničenja potrebna su dalja ispitivanja i unapređenja protokola izvođenja qPCR-a čime bi se obezbedila veća klinička upotrebljivost.

Rezultati ovog istraživanja koji su pokazali da se kombinovanom primenom konvencionalne dijagnostike sa qPCR-om postiže povećanje stope laboratorijskih dijagnoza malarije kao i pouzdanija identifikacija vrsta, predstavljaju naučnu osnovu za opravdanost uvođenja metoda zasnovanih na detekciji DNK plazmodijuma i u kliničku dijagnostiku u Srbiji. Međutim, osim dijagnostičkog značaja, primena qPCR-a značajno doprinosi i u epidemiološkoj proceni rizika od malarije na određenom području, što je od nemerljivog značaja u uslovima globalnih klimatskih promena i rastućeg rizika za uspostavljanje autohtone transmisije malarije. U ovom kontekstu, važan zaključak ovog istraživanja je da je

9. na osnovu nalaza da nijedan nosilac gametocita nije u letnjem periodu bio nosilac *P. vivax* gametocita, za koji su evropske vrste anofeličnih komaraca pogodni vektori, ocenjeno da je vulnerabilnost Beograda kao geografskog područja sa koga je poticao najveći broj bolesnika niska.

Iz gornjih zaključaka proističe i opšti zaključak ovog rada da se zbog pokazanog dijagnostičkog i epidemiološkog značaja primene molekularnih metoda u dijagnostici malarije, predlaže redefinisavanje dijagnostičkog algoritma za importovanu malariju u Srbiji. Konkretno:

10. U saradnji infektologa, epidemiologa i parazitologa potrebno je napraviti nacionalni vodič za malariju, kojim bi se u slučaju sumnje na importovanu malariju definisao precizan algoritam laboratorijske dijagnostike, koji uključuje postupanje kod inicijalno pozitivne/negativne mikroskopije, kao i kriterijume za primenu molekularne diagnostike i kliničko-laboratorijske parametre za hitnu dijagnostiku van radnog vremena parazitološke laboratorije.

11. U cilju prevencije uspostavljanja autohtone transmisije malarije, preporučuje se da se kao mera sniženja malariogenog potencijala u skrining asimptomatskih povratnika uvede jednokratni skrining qPCR u cilju isključenja nosilaštva gametocita plazmodijuma, koji bi se obavljao paralelno sa mikroskopijom.

## *LITERATURA*

## 7. LITERATURA

1. World Health Organization. World Malaria Report 2011. Available at [http://www.who.int/malaria/world\\_malaria\\_report\\_2011/en/](http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/en/)
2. Armengaud A, Legros F, D'Ortenzio E, Quatresous I, Barre H, Houze S, et al. A case of autochthonous *Plasmodium vivax* malaria, Corsica, August 2006. *Travel Med Infect Dis* 2008; 6(1-2), 36–40.
3. Danis K, Baka A, Lenglet A, Van Bortel W, Terzaki I, Tseroni M, et al. Autochthonous *Plasmodium vivax* malaria in Greece, 2011. *Euro Surveill* 2011; 16(42), 1–5.
4. Romi R, Boccolini D, Menegon M, Rezza G. Probable autochthonous introduced malaria cases in Italy in 2009-2011 and the risk of local vector-borne transmission. *Euro Surveill* 2012; 17(48), 2009–12.
5. Santa-Olalla Peralta P, Vazquez-Torres MC, Latorre-Fandos E, Mairal-Claver P, Cortina-Solano P, Puy-Azón A, et al. First autochthonous malaria case due to *Plasmodium vivax* since eradication, Spain, October 2010. *Euro Surveill* 2010; 15(41), 19684.
6. D'Acremont V, Landry P, Mueller I, Pécoud A, Genton B. Clinical and laboratory predictors of imported malaria in an outpatient setting: an aid to medical decision making in returning travelers with fever. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66(5), 481–6.
7. Hoffman SL, Subramanian GM, Collins FH, Venter JC. *Plasmodium*, human and *Anopheles* genomics and malaria. *Nature* 2002; 415(6872), 702–9.
8. World Health Organization. World Malaria Report 2013. Available at [http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2013/en/](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/en/)
9. Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Coetzee M, Mbogo CM, Hemingway J, et al. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in Africa, Europe and the Middle East: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasit Vector* 2010; 3(1), 117.
10. Bruce-Chwatt LJ. Essential malariology. 2nd ed. London: William Heinemann Medical Books Ltd; 1985. p. 452.
11. Bueno-Marí R, Jiménez-Peydró R. Study of the malariogenic potential of Eastern Spain. *Trop Biomed* 2012; 29(1), 39–50.
12. Romi R, Sabatinelli G, Majori G. Could malaria reappear in Italy? *Emerg Infect Dis*, 2001; 7(6), 915–8.
13. Price RN, Tjitra E, Guerra CA, Yeung S, White NJ, Anstey NM (2007): *Vivax* malaria: neglected and not benign. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 77(6 Suppl), 79–87.
14. Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 2005; 434(7030), 214–7.

15. Cox-Singh J, Singh B. *Knowlesi* malaria: newly emergent and of public health importance? Trends Parasitol 2008; 24(9), 406–10.
16. Petersen E, Severini C, Picot S. *Plasmodium vivax* malaria: a re-emerging threat for temperate climate zones? Travel Med Infect Dis 2013; 11(1), 51–9.
17. Oguike MC, Betson M, Burke M, Nolder D, Stothard JR, Kleinschmidt I, et al. *Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri* circulate simultaneously in African communities. Int J Parasitol 2011; 41(6), 677–83.
18. Sutherland CJ, Tanomsing N, Nolder D, Oguike M, Jennison C, Pukrittayakamee S, et al. Two nonrecombining sympatric forms of the human malaria parasite *Plasmodium ovale* occur globally. J Infect Dis 2010; 201(10), 1544–50.
19. Win TT, Jalloh A, Tantular IS, Tsuboi T, Ferreira MU, Kimura M, et al. Molecular analysis of *Plasmodium ovale* variants. Emerg Infect Dis 2004; 10(7), 1235–40.
20. May J, Mockenhaupt FP, Ademowo OG, Falusi AG, Olumese PE, Bienzle U, et al. High rate of mixed and subpatent malarial infections in southwest Nigeria. Am J Trop Med Hyg 1999; 61(2), 339–43.
21. Mehlotra RK, Lorry K, Kastens W, Miller SM, Alpers MP, Bockarie M, et al. Random distribution of mixed species malaria infections in Papua New Guinea. Am J Trop Med Hyg 2000; 62(2), 225–31.
22. Collins WE, Jeffery GM. *Plasmodium malariae*: parasite and disease. Clin Microbiol Rev 2007; 20(4), 579–92.
23. Mueller I, Zimmerman P, Reeder JC. *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*--the “bashful” malaria parasites. Trends Parasitol, 2007; 23(6), 278–83.
24. Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SSG, Cox-Singh J, et al. (2004): A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. Lancet, 2004; 363(9414), 1017–24.
25. White NJ. *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. Clin Infect Dis 2008; 46(2), 172–3.
26. Bronner U, Divis PCS, Färnert A, Singh B. Swedish traveller with *Plasmodium knowlesi* malaria after visiting Malaysian Borneo. Malaria J 2009; 8, 15.
27. Kantele A, Marti H, Felger I, Müller D, Jokiranta TS. Monkey malaria in a European traveler returning from Malaysia. Emerg Infect Dis 2008; 14(9), 1434–6.
28. Tang TTH, Salas A, Ali-Tammam M, Martínez MDC, Lanza M, Arroyo E, et al. First case of detection of *Plasmodium knowlesi* in Spain by real time PCR in a traveller from Southeast Asia. Malaria J 2010; 9, 219.
29. Čepić N. Epidemiološka, klinička i parazitološka studija importovane malarije u Srbiji. Beograd: Magistarski rad, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu. 1996.
30. Dakić Z, Pelemiš M, Djurković-Djaković O, Lavadinović L, Nikolić A, Stevanović G, et al. Imported malaria in Belgrade, Serbia, between 2001 and 2009. Wien Klin Wochenschr 2011; 123 Suppl. 1, 15–9.

31. Douglas NM, Simpson J, Phyto AP, Siswanto H, Hasugian AR, Kenangalem E, et al. Gametocyte dynamics and the role of drugs in reducing the transmission potential of *Plasmodium vivax*. *J Infect Dis* 2013; 208(5), 801–12.
32. Peatey CL, Leroy D, Gardiner DL, Trenholme KR. Anti-malarial drugs: how effective are they against *Plasmodium falciparum* gametocytes? *Malaria J* 2012; 11, 34.
33. Wampfler R, Mwingira F, Javati S, Robinson L, Betuela I, Siba P, et al. Strategies for detection of *Plasmodium* species gametocytes. *PloS One* 2013; 8(9), e76316.
34. Ferreira A, Marguti I, Bechmann I, Jeney V, Chora A, Palha NR, et al. Sick cell hemoglobin confers tolerance to *Plasmodium* infection. *Cell* 2011; 145(3), 398–409.
35. Woldearegai TG, Kreamsner PG, Kun JFJ, Mordmüller B. *Plasmodium vivax* malaria in Duffy-negative individuals from Ethiopia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2013; 107(5), 328–31.
36. Sangaré L, van Eijk AM, Ter Kuile FO, Walson J, Stergachis A. The association between malaria and iron status or supplementation in pregnancy: a systematic review and meta-analysis. *PloS One* 2014; 9(2), e87743.
37. Greenwood T, Vikerfors T, Sjöberg M, Skeppner G, Färnert A. Febrile *Plasmodium falciparum* malaria 4 years after exposure in a man with sickle cell disease. *Clin Infect Dis* 2008; 47(4), e39–41.
38. Vinetz JM, Li J, McCutchan TF, Kaslow DC. *Plasmodium malariae* infection in an asymptomatic 74-year-old Greek woman with splenomegaly. *New Engl J Med* 1998; 338, 367–71.
39. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature*, 2002; 415(6872), 673–9.
40. Kwiatowski D, Hill AVS, Sambou I, Twumasi P. TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet* 1990; 336, 1201–4.
41. Miller LH, Ackerman HC, Su X, Wellems TE. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nature Med* 2013; 19(2), 156–67.
42. Lee WC, Chin PW, Lau YL, Chin LC, Fong MY, Yap CJ, et al. Hyperparasitaemic human *Plasmodium knowlesi* infection with atypical morphology in peninsular Malaysia. *Malaria J*, 2013; 12(1), 88.
43. Cox-Singh J, Hiu J, Lucas SB, Divis PC, Zulkarnaen M, Chandran P, et al. Severe malaria - a case of fatal *Plasmodium knowlesi* infection with post-mortem findings: a case report. *Malaria J* 2010; 9, 10.
44. Thein SL, Rees D. Haemoglobin and the inherited disorders of globin synthesis. In: Hoffbrand AV, Catovsky D, Tuddenham EGD, Green AR, editors. *Postgraduate haematology*. 6th ed. Massachusetts: Blackwell Publishing; 2005. p. 83–108.
45. World Health Organization. Severe *falciparum* malaria. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94 Suppl 1, S1–90.

46. Poluga J, Dopsaj V, Veljkovic M, Maksic N, Stojakovic S, Dunjic R, et al. Increased tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 serum levels and their correlation with laboratory parameters in patients with imported malaria. *Arch Biol Sci* 2012; 64(4), 1577–83.
47. Dondorp A, Nosten F, Stepniewska K, Day N, White N. Artesunate versus quinine for treatment of severe *falciparum* malaria: a randomised trial. *Lancet* 2005; 366(9487), 717–25.
48. Gething PW, Patil AP, Smith DL, Guerra CA, Elyazar IRF, Johnston GL, et al. A new world malaria map: *Plasmodium falciparum* endemicity in 2010. *Malaria J* 2011; 10, 378.
49. Rojo-Marcos G, Rubio-Muñoz JM, Ramírez-Olivencia G, García-Bujalance S, Elcuaz-Romano R, Díaz-Menéndez M, et al. Comparison of imported *Plasmodium ovale curtisi* and *P. ovale wallikeri* infections among patients in Spain 2005-2011. *Emerg Infect Dis* 2014; 20(3), 2005–11.
50. Calderaro A, Piccolo G, Perandin F, Gorrini C, Peruzzi S, Zuelli C, et al. Genetic polymorphisms influence *Plasmodium ovale* PCR detection accuracy. *J Clin Microbiol* 2007; 45(5), 1624–7.
51. Bashawri LM, Mandil A, Bahnassy A, Ahmed M. Malaria: hematological aspects. *Ann Saudi Med* 2002; 22(5-6), 372–6.
52. Taha K, El-dein SZ, Idrees M, Makboul G, Baidas G. Hematological changes in malaria: relation to *Plasmodium* species. *Kuwait Med J* 2007; 39(3), 262–7.
53. Centers for Disease Control and Prevention. Treatment of malaria (Guidelines for clinicians). 2013, p. 8.  
Retrieved from <http://www.cdc.gov/malaria/resources/pdf/clinicalguidance.pdf>.
54. Flegg J, Guerin PJ, White NJ, Stepniewska K. Standardizing the measurement of parasite clearance in *falciparum* malaria: the parasite clearance estimator. *Malaria J*, 2011; 10(1), 339.
55. White NJ. The parasite clearance curve. *Malaria J* 2011; 10(278), 1–8.
56. Jelinek T (2013): Artemisinin based combination therapy in travel medicine. *Travel Med Infect Dis* 2013; 11(1), 23–8.
57. Hanscheid T. Diagnosis of malaria: a review of alternatives to conventional microscopy. *Clin Lab Haematol* 1999; 21(4), 235–45.
58. Erdman LK, Kain KC. Molecular diagnostic and surveillance tools for global malaria control. *Travel Med Infect Dis* 2008; 6(1-2), 82–99.
59. Rodulfo H, De Donato M, Mora R, González L, Contreras CE. Comparison of the diagnosis of malaria by microscopy, immunochromatography and PCR in endemic areas of Venezuela. *Braz J Med Biol Res* 2007; 40(4), 535–43.
60. Tangpukdee N, Duangdee C, Wilairatana P, Krudsood S. Malaria diagnosis: a brief review. *Korean J Parasitol* 2009; 47(2), 93–102.



61. Ross R. An improved method for the microscopical diagnosis of intermittent fever. *Lancet* 1903; 161(4141), 63.

62. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 61(2), 315–20.

63. MTMSP (2008): United Republic of Tanzania Ministry of Health and Social Welfare. Retrieved from United Republic of Tanzania, National Malaria Control Programme (NMCP): Mid term strategic plan 2008-2013.

Available at

[http://ihi.eprints.org/1890/1/NMCP\\_Comm\\_Strategy\\_final\\_Sept\\_2010%281%29.pdf](http://ihi.eprints.org/1890/1/NMCP_Comm_Strategy_final_Sept_2010%281%29.pdf)

64. Tanzania, United Republic, and Welfare Ministry of Health and Social Welfare. *National Guidelines for Diagnosis and Treatment of Malaria*. Retrieved from United Republic of Tanzania, Ministry of Health and Social Welfare: National guidelines for malaria diagnosis and treatment. Malaria control series 11. Dar es Salaam, Tanzania; 2006.

Available at <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s19271en/s19271en.pdf>

65. Amexo M, Tolhurst R, Barnish G, Bates I. Malaria misdiagnosis: effects on the poor and vulnerable. *Lancet* 2004; 364(9448), 1896–8.

66. Ramírez-Olivencia G, Rubio JM, Rivas P, Subirats M, Herrero MD, Lago M, Puente S. Imported submicroscopic malaria in Madrid. *Malaria J*, 2012; 11, 324.

67. Touré FS, Mezui-Me-Ndong J, Ouwe-Missi-Oukem-Boyer O, Ollomo B, Mazier D, Bisser S. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* infections before and after sulfadoxine-pyrimethamine and artesunate association treatment in Dienga, Southeastern Gabon. *Clin Med Res* 2006; 4(3), 175–9.

68. Moody A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites rapid diagnostic tests for malaria parasites, *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(1), 66-78.

69. Dowling M, Shute G. A comparative study of thick and thin blood films in the diagnosis of scanty malaria parasitaemia. *Bull World Health Organ* 1966; 249–67.

70. Gilles HM. Diagnostic methods in malaria. in: HM Gilles, Warrell DA, editors. *Bruce-Chwatt's Essential Malariology*. 3rd ed. London: Edward Arnold; 1993. p. 78–95.

71. White NJ, Silamut K. Rapid diagnosis of malaria. *Lancet* 1989; 8635, 435.

72. Nguyen PH, Day N, Pram TD, Ferguson DJ, White NJ. Intraleucocytic malaria pigment and prognosis in severe malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995; 89(2), 200–4.

73. Kain KC, Kyle DE, Wongsrichanalai C, Brown E, Webster HK, Vanijanonta S, et al. Qualitative and semiquantitative polymerase chain reaction to predict *Plasmodium falciparum* treatment failure. *J Infect Dis* 1994; 170(6), 1626–30.

74. Xiaodong S, Tambo E, Chun W, Zhibin C, Yan D, Jian W, et al. Diagnostic performance of CareStart™ malaria HRP2/pLDH (Pf/pan) combo test versus standard microscopy on *falciparum* and *vivax* malaria between China-Myanmar endemic borders. *Malaria J* 2013; 12(1), 6.



75. Aydin-Schmidt B, Mubi M, Morris U, Petzold M, Ngasala BE, Premji Z, et al. Usefulness of *Plasmodium falciparum*-specific rapid diagnostic tests for assessment of parasite clearance and detection of recurrent infections after artemisinin-based combination therapy. *Malaria J* 2013; 12, 349.
76. Iqbal J, Hira PR, Sher A, Al-Enezi AA. Diagnosis of imported malaria by *Plasmodium* lactate dehydrogenase (pLDH) and histidine-rich protein 2 (PfHRP-2)-based immunocapture assays. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 64(1-2), 20–3.
77. Craig MH, Bredenkamp BL, Williams CHV, Rossouw EJ, Kelly VJ, Kleinschmidt I, et al. Field and laboratory comparative evaluation of ten rapid malaria diagnostic tests. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96(3), 258–65.
78. Bousema T, Youssef RM, Cook J, Cox J, Alegana VA, Amran J, et al. Serologic markers for detecting malaria in areas of low endemicity, Somalia, 2008. *Emerg Infect Dis* 2010; 16(3), 392–9.
79. Singh B, Bobogare A, Cox-Singh J, Snounou G, Abdullah MS, Rahman H. A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60(4), 687–92.
80. Tham JM, Lee SH, Tan TM, Ting RC, Kara U. Detection and species determination of malaria parasites by PCR: comparison with microscopy and with ParaSight-F and ICT malaria Pf tests in a clinical environment. *J Clin Microbiol* 1999; 37(5), 1269–73.
81. Färnert A, Arez AP, Babiker HA, Beck HP, Benito A, Björkman A, et al. Genotyping of *Plasmodium falciparum* infections by PCR: a comparative multicentre study. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95(2), 225–32.
82. Bartlett JMS, Stirling D. PCR Protocols. 2nd ed. New Jersey: Humana Press, Totowa; 2003. p. 83.
83. Kamau E, Alemayehu S, Feghali KC, Saunders D, Ockenhouse CF. Multiplex qPCR for detection and absolute quantification of malaria. *PLoS One* 2013; 8(8), e71539.
84. McCuthan TF, de la Cruz VF, Lal AA, Gunderson JH, Elwood HJ, Sogin ML. Primary sequences of two small subunit ribosomal RNA genes from *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 1988; 28, 63–8.
85. Andrade BB, Reis-Filho A, Barros AM, Souza-Neto SM, Nogueira, LL, Fukutani KF, et al. Towards a precise test for malaria diagnosis in the Brazilian Amazon: comparison among field microscopy, a rapid diagnostic test, nested PCR, and a computational expert system based on artificial neural networks. *Malaria J* 2010; 9, 117.
86. Johnston SP, Pieniazek NJ, Manipheth V, Slemenda SB, Wilkins PP, Silva AJ, et al. PCR as a confirmatory technique for laboratory diagnosis of malaria. *J Clin Microbiol* 2006; 44(3): 1087–9.
87. Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain

reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 58(2), 283–92.

88. Dorak MT. Real-time PCR (Advanced methods). Dorak MT, editor. 1st ed. New York. Taylor & Francis; 2006.

89. Chaudry JZ, Ahmed S, Qureshi TZ, Ali N. Real time polymerase chain reaction for the detection of malarial parasite. *J Coll Physicians Surg Pak* 2012; 22(2), 98–100.

90. Dormond L, Jatton-Ogay K, de Vallière S, Genton B, Bille J, Greub G. Multiplex real-time PCR for the diagnosis of malaria: correlation with microscopy. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17(3), 469–75.

91. Khairnar K, Martin D, Lau R, Ralevski F, Pillai DR. Multiplex real-time quantitative PCR, microscopy and rapid diagnostic immuno-chromatographic tests for the detection of *Plasmodium* spp: performance, limit of detection analysis and quality assurance. *Malaria J* 2009; 8, 284.

92. Perandin F, Manca N, Calderaro A, Piccolo G, Galati L, Ricci L, et al. Development of a real-time PCR assay for detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for routine clinical diagnosis. *J Clin Microbiol* 2004; 42(3), 1214–9.

93. Cnops L, Jacobs J, Van Esbroeck M. Validation of a four-primer real-time PCR as a diagnostic tool for single and mixed *Plasmodium* infections. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17(7), 1101–7.

94. Morassin B. One year's experience with the polymerase chain reaction as a routine method for the diagnosis of imported malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66, 503–8.

95. Bialasiewicz S, Whiley DM, Nissen MD, Sloots TP. Impact of competitive inhibition and sequence variation upon the sensitivity of malaria PCR. *J Clin Microbiol* 2007; 45(5), 1621–3.

96. Calderaro A, Gorrini C, Peruzzi S, Piccolo G, Dettori G, Chezzi C. An 8-year survey on the occurrence of imported malaria in a nonendemic area by microscopy and molecular assays. *Diagn Micr Infec Dis* 2008; 61(4), 434–9.

97. Divis PCS, Shokoples SE, Singh B, Yanow SK. A TaqMan real-time PCR assay for the detection and quantitation of *Plasmodium knowlesi*. *Malaria J* 2010; 9(1), 344.

98. Farcas GA, Zhong KJY, Mazzulli T, Kain KC. Evaluation of the RealArt malaria LC real-time PCR assay for malaria diagnosis. *J Clin Microbiol* 2004; 42(2), 636–8.

99. Mangold KA, Manson RU, Koay ESC, Stephens L, Regner M, Thomson RB, et al. Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium* spp. *J Clin Microbiol* 2005; 43(5), 2435–40.

100. Rougemont M, Saanen MV, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, Jatton K. Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. *J Clin Microbiol*, 2004; 42(12), 5636–43.

101. Shokoples SE, Ndao M, Kowalewska-Grochowska K, Yanow SK. Multiplexed real-time PCR assay for discrimination of *Plasmodium* species with improved sensitivity for mixed infections. *J Clin Microbiol* 2009; 47(4), 975–80.
102. Igbinosa O, Igbinosa O, Asowata O, Jeffery C.A sequential review on accuracy of detecting malaria parasitemia in developing countries with large restriction on resources. *J Med Medical Sci* 2010; 1(9), 385–90.
103. World Health Organization. New Perspectives: Malaria diagnosis. In: Report of a joint WHO/USAID informal consultation. Geneva, Switzerland. 2000. p. 1–29.  
Available at [http://www.who.int/malaria/publications/atoz/who\\_cds\\_rbm\\_2000\\_14/en/](http://www.who.int/malaria/publications/atoz/who_cds_rbm_2000_14/en/)
104. Mlambo G, Vasquez Y, LeBlanc R, Sullivan D, Kumar N. A filter paper method for the detection of *Plasmodium falciparum* gametocytes by reverse transcription polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 78(1), 114–6.
105. Polley SD, Mori Y, Watson J, Perkins MD, González IJ, Notomi T, et al. Mitochondrial DNA targets increase sensitivity of malaria detection using loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol* 2010; 48(8), 2866–71.
106. Poon LLM, Wong BWY, Ma EHT, Chan KH, Chow LMC, Abeyewickreme W, et al. Sensitive and inexpensive molecular test for *falciparum* malaria: detecting *Plasmodium falciparum* DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification. *Clin Chem* 2006; 52(2), 303–6.
107. Schneider P, Bousema T, Omar S, Gouagna L, Sawa P, Schallig H, et al. (Sub)microscopic *Plasmodium falciparum* gametocytaemia in Kenyan children after treatment with sulphadoxine-pyrimethamine monotherapy or in combination with artesunate. *Int J Parasitol* 2006; 36(4), 403–8.
108. Chiodini PL, Moody AH, Manser DW. Atlas of Medical Helminthology and Protozoology. Horne T, editor. 4th ed. London: Churchill Livingstone; 2001. p. 61-9.
109. Lee KS, Cox-Singh J, Singh B. Morphological features and differential counts of *Plasmodium knowlesi* parasites in naturally acquired human infections. *Malaria J* 2009; 8, 73.
110. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977; 33(1), 159–74.
111. Rantala AM, Taylor SM, Trottman P, Luntamo M, Mbewe B, Maleta K, et al. Comparison of real-time PCR and microscopy for malaria parasite detection in Malawian pregnant women. *Malaria J* 2010; 9(1), 269.
112. Shokoples S, Mukhi SN, Scott AN, Yanow SK. Impact of routine real-time PCR testing of imported malaria over 4 years of implementation in a clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 2013; 51(6), 1850–4.
113. Berry A, Benoit-Vical F, Fabre R, Cassaing S, Magnaval JF. PCR-based methods to the diagnosis of imported malaria. *Parasite* 2008; 15(3), 484–8.
114. Snounou G, Singh B. Nested PCR analysis of *Plasmodium* parasites. In: Doolan DL editor. *Malaria Methods and Protocols*. New Jersey: Humana Press, Totowa; 2002. Vol. 72, p. 189–203.

115. Bourgeois N, Boutet A, Bousquet PJ, Basset D, Douard-Enault C, Charachon S, et al. Comparison of three real-time PCR methods with blood smears and rapid diagnostic test in *Plasmodium* sp. infection. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16(8), 1305–11.
116. Matisz CE, Naidu P, Shokoples SE, Grice D, Krinke V, Brown SZ, et al. Post-arrival screening for malaria in asymptomatic refugees using real-time PCR. *Am J Trop Med Hyg* 2011; 5(84), 161–5.
117. Mixson-Hayden T, Lucchi NW, Udhayakumar V. Evaluation of three PCR-based diagnostic assays for detecting mixed *Plasmodium* infection. *BMC Res Notes* 2010; 3, 88.
118. Roberts CH, Armstrong M, Zatyka E, Boadi S, Warren S, Chiodini PL, et al. Gametocyte carriage in *Plasmodium falciparum*-infected travellers. *Malaria J* 2013; 12(1), 31.
119. Romi R, Boccolini D, D’Amato S, Cenci C, Peragallo M, D’Ancona F, et al. Incidence of malaria and risk factors in Italian travelers to malaria endemic countries. *Travel Med Infect Dis* 2010; 8(3), 144–54.
120. Skarbinski J, James EM, Causer LM, Barber AM, Mali S, Nguyen-Dinh P, et al. Malaria surveillance--United States, 2004. *MMWR Surveill Summ* 2006; 55(4), 23–37.
121. Rossi IA, D’Acremont V, Prod’Hom G, Genton B. Safety of *falciparum* malaria diagnostic strategy based on rapid diagnostic tests in returning travellers and migrants: a retrospective study. *Malaria J* 2012; 11, 377.
122. Pasricha JM, Juneja S, Manitta J, Whitehead S, Maxwell E, Goh WK, et al. Is serial testing required to diagnose imported malaria in the era of rapid diagnostic tests? *Am J Trop Med Hyg* 2013; 88(1), 20–3.
123. White NJ, Krishna S, Waller D, Craddock C, Kwiatkowski D, Brewster D. Open comparison of intramuscular chloroquine and quinine in children with severe chloroquine-sensitive *falciparum* malaria. *Lancet* 1989; 2(8675), 1313–6.
124. Kahama-Maró J, D’Acremont V, Deo M, Blaise G, Lengeler C. Low quality of routine microscopy for malaria at different levels of the health system in Dar es Salaam. *Malaria J* 2011; 10, 322.
125. NCCLS (2000): Laboratory diagnosis of blood-borne parasitic diseases. 2000. Vol. 20, No. 12. Retrieved from NCCLS: Laboratory diagnosis of blood-borne parasitic diseases; approved guideline.
126. Edson DC, Glick T, Massey LD. Detection and identification of malaria parasites: A review of proficiency test results and laboratory practices. *Lab Med* 2010; 41(12), 719–23.
127. Abanyie F, Arguin PM, Gutman J. State of malaria diagnostic testing at clinical laboratories in the United States, 2010: a nationwide survey. *Malaria J* 2011; 10(1), 340.
128. Thomson S, Lohmann RC, Crawford L, Dubash R, Richardson H. External quality assessment in the examination of blood films for malarial parasites within Ontario, Canada. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124(1), 57–60.

129. Milne LM, Kyi MS, Chiodini PL, Warhurst DC. Accuracy of routine laboratory diagnosis of malaria in the United Kingdom. *J Clin Pathol* 1994; 47(8), 740–2.
130. Maltha J, Gillet P, Heutmekers M, Bottieau E, Van Gompel A, Jacobs J. Self-diagnosis of malaria by travelers and expatriates: assessment of malaria rapid diagnostic tests available on the internet. *PloS One* 2013; 8(1), e53102.
131. Bastiaens GJH, Bousema T, Leslie T. Scale-up of malaria rapid diagnostic tests and artemisinin-based combination therapy: challenges and perspectives in sub-Saharan Africa. *PLoS Medicine* 2014; 11(1), e1001590.
132. Jarra W, Snounou G. Only viable parasites are detected by PCR following clearance of rodent malarial infections by drug treatment or immune responses. *Infect Immun* 1998; 66(8), 3783–7.
133. Yao Y, Nellåker C, Karlsson H. Evaluation of minor groove binding probe and Taqman probe PCR assays: Influence of mismatches and template complexity on quantification. *Mol Cell Probe* 2006; 20(5), 311–6.
134. Bustin SA. Why the need for qPCR publication guidelines?-The case for MIQE. *Methods* 2010; 50(4), 217–26.
135. Lee S, Crouse C, Kline M. Optimizing storage and handling of DNA extracts. *Forensic Sci Rev* 2010; 20(2), 131–44.
136. Farrugia C, Cabaret O, Botterel F, Bories C, Foulet F, Costa JM, Bretagne S. Cytochrome b gene quantitative PCR for diagnosing *Plasmodium falciparum* infection in travelers. *J Clin Microbiol* 2011; 49(6), 2191–5.
137. Veron V, Simon S, Carme B. Multiplex real-time PCR detection of *P. falciparum*, *P. vivax* and *P. malariae* in human blood samples. *Exp Parasitol* 2009; 121(4), 346–51.
138. Hermsen CC, Telgt DS, Linders EH van de Locht LA, Eling WM, Mensink EJ, Sauerwein RW. Detection of *Plasmodium falciparum* malaria parasites *in vivo* by real-time quantitative PCR. *Mol Biochem Parasit* 2001; 118(2), 247–51.
139. Lee MA, Tan CH, Aw LT, Tang CS, Singh M, Lee SH, et al. Real-time fluorescence-based PCR for detection of malaria parasites. *J Clin Microbiol* 2002; 40(11), 4343–5.
140. Alemayehu S, Feghali KC, Cowden J, Komisar J, Ockenhouse CF, Kamau E. Comparative evaluation of published real-time PCR assays for the detection of malaria following MIQE guidelines. *Malaria J* 2013; 12(1), 277.
141. Henning L, Felger I, Beck HP. Rapid DNA extraction for molecular epidemiological studies of malaria. *Acta Trop* 1999; 72(2), 149–55.
142. Kamau E, Tolbert LS, Kortepeter L, Pratt M, Nyakoe N, Muringo L, et al. Development of a highly sensitive genus-specific quantitative reverse transcriptase real-time PCR assay for detection and quantitation of *Plasmodium* by amplifying RNA and DNA of the 18S rRNA genes. *J Clin Microbiol* 2011; 49(8), 2946–53.
143. Shkurti K, Vyshka G, Velo E, Boçari A, Kokici M, Kraja D. Imported malaria in Albania and the risk factors that could allow its reappearance. *Malaria J* 2013; 12, 197.



144. Šubelj M, Sočan M. Imported malaria in Slovenia, 2001–2011. *Cent Eur J Med* 2012; 7(3), 290–5.
145. Mulić R. Malaria in Croatia: from eradication until today. *Malaria J* 2012; 11(Suppl 1), P135.
146. Paglia MG, Vairo F, Bevilacqua N, Ghirga P, Narciso P, Severini C, et al. Molecular diagnosis and species identification of imported malaria in returning travellers in Italy. *Diagn Micr InfecDis* 2012; 72(2), 175–80.
147. Golassa L, Enweji N, Erko B, Aseffa A, Swedberg G. Detection of a substantial number of sub-microscopic *Plasmodium falciparum* infections by polymerase chain reaction: a potential threat to malaria control and diagnosis in Ethiopia. *Malaria J* 2013; 12(1), 352.
148. Roper C, Elhassan IM, Hviid L, Giha H, Richardson W, Babiker H, et al. Detection of very low level *Plasmodium falciparum* infections using the nested polymerase chain reaction and a reassessment of the epidemiology of unstable malaria in Sudan. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 54(4), 325–31.
149. Shekalaghe SA, Bousema JT, Kunei KK, Lushino P, Masokoto A, Wolters LR, et al. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage is common in an area of low and seasonal transmission in Tanzania. *Trop Med Int Health* 2007; 12(4), 547–53.
150. Shekalaghe S, Alifrangis M, Mwanziva C, Enevold A, Mwakalinga S, Mkali H, et al. Low density parasitaemia, red blood cell polymorphisms and *Plasmodium falciparum* specific immune responses in a low endemic area in northern Tanzania. *BMC Infect Dis* 2009; 9, 69.
151. McKenzie FE, Sirichaisinthop J, Miller RS, Gasser RA, Wongsrichanalai C. Dependence of malaria detection and species diagnosis by microscopy on parasite density. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 69(4), 372–6.
152. Price RN. Improving the radical cure of *Plasmodium vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2014; 91(1), 3–4.
153. Obare P, Ogutu B, Adams M, Odera JS, Lilley K, Dosoo D, et al. Misclassification of *Plasmodium* infections by conventional microscopy and the impact of remedial training on the proficiency of laboratory technicians in species identification. *Malaria J* 2013; 12, 113.
154. Incardona S, Chy S, Chiv LIM, Nhem S, Sem R, Hewitt S, et al. Large sequence heterogeneity of the small subunit ribosomal. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 72(6), 719–24.
155. Culleton RL, Mita T, Ndounga M, Unger H, Cravo PVL, Paganotti GM, et al. (2008): Failure to detect *Plasmodium vivax* in West and Central Africa by PCR species typing. *Malaria J* 2008; 7, 174.
156. Calderaro A, Piccolo G, Gorrini C, Rossi S, Montecchini S, Dell’Anna ML, et al. Accurate identification of the six human *Plasmodium* spp. causing imported malaria, including *Plasmodium ovale wallikeri* and *Plasmodium knowlesi*. *Malaria J* 2013; 12(1), 321.

157. Win TT, Lin K, Mizuno S, Zhou M, Liu Q, Ferreira MU, et al. (2002): Wide distribution of *Plasmodium ovale* in Myanmar. *Trop Med Int Health* 2002; 7(3), 231–9.
158. Calderaro A, Piccolo G, Gorrini C, Montecchini S, Rossi S, Medici MC, et al. A new real-time PCR for the detection of *Plasmodium ovale wallikeri*. *PloS One* 2012; 7(10), e48033.
159. Nolder D, Oguike MC, Maxwell-Scott H, Niyazi HA, Smith V, Chiodini PL, et al. An observational study of malaria in British travellers: *Plasmodium ovale wallikeri* and *Plasmodium ovale curtisi* differ significantly in the duration of latency. *BMJ Open* 2013; 3(5).
160. Bousema T, Okell L, Shekalaghe S, Griffin JT, Omar S, Sawa P, et al. Revisiting the circulation time of *Plasmodium falciparum* gametocytes: molecular detection methods to estimate the duration of gametocyte carriage and the effect of gametocytocidal drugs. *Malaria J* 2010; 9, 136.
161. Beshir KB, Hallett RL, Eziefula AC, Bailey R, Watson J, Wright SG, et al. Measuring the efficacy of anti-malarial drugs *in vivo*: quantitative PCR measurement of parasite clearance. *Malaria J* 2010; 9(1), 312.
162. Brown AE, Kain KC, Pipithkul J, Webster HK. Demonstration by the polymerase chain reaction of mixed *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infections undetected by conventional microscopy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992; 86(6), 609–12.
163. Myjak P, Nahorski W, Pieniazek NJ, Pietkiewicz H. Usefulness of PCR for diagnosis of imported malaria in Poland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21(3), 215–8.
164. Kain KC, Harrington M, Tennyson S, Keystone JS. Imported malaria: prospective analysis of problems in diagnosis and management. *Clin Infect Dis* 1998; 27(1), 142–9.
165. Bottius E, Guanzirolli A, Trape JF, Rogier C, Konate L, Druilhe P. Malaria: even more chronic in nature than previously thought; evidence for subpatent parasitaemia detectable by the polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996; 90(1), 15–9.
166. Alves FP, Gil LHS, Marrelli MT, Ribolla PEM, Camargo EP, Da Silva LHP. Asymptomatic carriers of *Plasmodium* spp. as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon. *J Med Entomol*, 2005; 42(5), 777–9.
167. Vinetz JM, Gilman RH. Asymptomatic *Plasmodium* parasitemia and the ecology of malaria transmission. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66(6), 639–40.
168. Monge-Maillo B, López-Vélez R. Migration and malaria in Europe. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2012; 4(1), e2012014.
169. Mascarello M, Allegranzi B, Angheben A, Anselmi M, Concia E, Laganà S, et al. Imported malaria in adults and children: epidemiological and clinical characteristics of 380 consecutive cases observed in Verona, Italy. *J Travel Med* 2008; 15(4), 229–36.

170. Driessen GJ, Pereira RR, Brabin BJ, Hartwig NG. Imported malaria in children: a national surveillance in the Netherlands and a review of European studies. *Eur J Public Health* 2008; 18(2), 184–8.
171. Monge-Maillo B, López-Vélez R. Is screening for malaria necessary among asymptomatic refugees and immigrants coming from endemic countries? *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011; 9(5), 521–4.
172. Pourmoshtagh H. Comparison of polymerase chain reaction (PCR) and peripheral blood smear (PBS) for diagnosis of asymptomatic malaria parasitemia. *Iranian J Clin Infect Dis* 2012; 7(1), 7–9.
173. Rosanas-Urgell A, Mueller D, Betuela I, Barnadas C, Iga J, Zimmerman P, et al. Comparison of diagnostic methods for the detection and quantification of the four sympatric *Plasmodium* species in field samples from Papua New Guinea. *Malaria J* 2010; 9(1), 361.
174. Perić D, Škrobonja I, Škrobonja A. Malaria in Croatia in the period between 1987 to 2006. *Lijec Vjesn* 2009; 131(7-8), 192–5.
175. Liu Y, Hsiang MS, Zhou H, Wang W, Cao Y, Gosling RD, et al. Malaria in overseas labourers returning to China: an analysis of imported malaria in Jiangsu Province, 2001-2011. *Malaria J* 2014; 13, 29.
176. Cibulskis RE, Aregawi M, Williams R, Otten M, Dye C. Worldwide incidence of malaria in 2009: estimates, time trends, and a critique of methods. *PLoS Med* 2011; 8(12), e1001142.
177. Rubio JM, Benito A, Berzosa PJ, Roche J, Puente S, Subirats M, et al. Usefulness of seminested multiplex PCR in surveillance of imported malaria in Spain. *J Clin Microbiol* 1999; 37(10), 3260–4.
178. Millet JP, de Olalla PG, Gascón J, Prat JGI, Treviño B, Pinazo MJ, et al. Imported malaria among African immigrants: is there still a relationship between developed countries and their ex-colonies? *Malaria J* 2009; 8, 111.
179. Neghina R, Neghina AM, Giurgiu LD, Marincu I, Iacobiciu I. Import of malaria in a Romanian western county. *Travel Med Infect Dis* 2008; 6(4), 215–8.
180. Doudier B, Bogreau H, DeVries A, Ponçon N, Stauffer WM, Fontenille D, et al. Possible autochthonous malaria from Marseille to Minneapolis. *Emerg Infect Dis* 2007; 13(8), 1236–8.
181. Miyake H, Kimura M, Wataya Y. PCR diagnosis of malaria at convalescent stage post-treatment. *J Travel Med* 1996; 3(2), 119–21.
182. Wickramasinghe SN, Abdalla SH. Blood and bone marrow changes in malaria. *Baillière's best practice and research. Clin Haematol* 2000; 13(2), 277–99.
183. Gjørup I, Vestergaard L, Kirsten Møller K, Rønn A, Ib B. Laboratory indicators of the diagnosis and course of imported malaria. *Scand J Infect Dis* 2007; 39(8), 707–13.
184. Patel U, Gandhi G, Friedman S, Niranjana S. Thrombocytopenia in malaria. *J Natl Med Assoc* 2004; 96(9), 1212–4.



185. Ladhani S, Khatri P, El-Bashir H, Shingadia D. Imported malaria is a major cause of thrombocytopenia in children presenting to the emergency department in east London. *Br J Haematol* 2005; 129(5), 707–9.
186. Lacerda MVG, Mourão MPG, Coelho HCC, Santos JB. Thrombocytopenia in malaria: who cares? *Mem I Oswaldo Cruz* 106 Suppl, 2011; 52–63.
187. Saravu K, Docherla M, Vasudev A, Shastry BA. Thrombocytopenia in *vivax* and *falciparum* malaria: an observational study of 131 patients in Karnataka, India. *Ann Trop Med Parasitol* 2011; 105(8), 593–8.
188. Stauga S, Hahn A, Brattig NW, Fischer-Herr J, Baldus S, Burchard GD, et al. Clinical relevance of different biomarkers in imported *Plasmodium falciparum* malaria in adults: a case control study. *Malaria J* 2013; 12(1), 246.
189. Baldari M, Tamburro A, Sabatinelli G, Romi R, Severini C, Cuccagna G, et al. Malaria in Maremma, Italy. *Lancet* 1998; 351(9111), 1246–7.
190. Vutchev D. Tertian malaria outbreak three decades after its eradication. *Jpn J Infect Dis* 2001; 54(2), 79–80.
191. Kampen H, Proft J, Etti S, Maltezos E, Pagonaki M, Maier WA, et al. Individual cases of autochthonous malaria in Evros Province, northern Greece: entomological aspects. *Parasitol Res* 2003; 89(4), 252–8.
192. European Centre for Disease Control and Prevention. Update on autochthonous *Plasmodium vivax* malaria in Greece Main conclusions and recommendations consulted, (October 2012).
- Retrieved from  
[http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/131003\\_TER\\_Malaria\\_Greece\\_Risk\\_Assessment.pdf](http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/131003_TER_Malaria_Greece_Risk_Assessment.pdf).
193. Florescu SA, Popescu CP, Calistru P, Ceausu E, Nica M, Toderan A, et al. *Plasmodium vivax* malaria in a Romanian traveller returning from Greece, August 2011. *Euro Surveill* 2011; 16(35).
194. Price RN, Nosten F, Luxemburger C, ter Kuile FO, Paiphun L, Chongsuphajaisiddhi T, et al. Effects of artemisinin derivatives on malaria transmissibility. *Lancet* 1996; 347(9016), 1654–8.
195. Sowunmi A, Okuboyejo TM, Gbotosho GO, Happi CT. Risk factors for gametocyte carriage in uncomplicated *falciparum* malaria in children before and after artemisinin-based combination treatments. *Chemotherapy* 2011; 57(6), 497–504.
196. Dakić Z, Kulišić Z, Stajković N, Pelemiš M, Čobeljić M, Stanimirović Z, et al. Ecology of *Anopheles* mosquitoes in Belgrade area: Estimating vector potential for malaria retransmission. *Acta Vet* 2008; 58(5-6), 603–14.
197. De Zulueta J, Ramsdale CD, Coluzzi M. Receptivity to malaria in Europe. *Bull World Health Organ* 1975;52(1):109-11.
198. Kuamsab N, Putaporntip C, Pattanawong U, Jongwutiwes S. Simultaneous detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* gametocytes in clinical isolates by multiplex-nested RT-PCR. *Malar J* 2012;11:190.

199. Marchant P, Eling W, van Gemert GJ, Leake CJ, Curtis CF. Could british mosquitoes transmit *falciparum* malaria? *Parasitol Today* 1998; 14(9):344-5.
200. Beck HP. Extraction and purification of *Plasmodium* parasite DNA. In: Doolan DL editor. *Malaria Methods and Protocols*. New Jersey: Humana Press, Totowa; 2002. Vol. 72, p. 159–63.

## ***SPISAK SKRAĆENICA***

## SPISAK SKRAĆENICA

<i>P.</i>	-	<i>Plasmodium</i>
<i>A.</i>	-	<i>Anopheles</i>
Ji Azija	-	jugoistočna Azija
SZO	-	Svetska zdravstvena organizacija
Klinika	-	Klinika za infektivne i tropske bolesti
KCS	-	Klinički centar Srbije
Er	-	eritrocit
Hgb	-	hemoglobin
par/ $\mu$ L	-	broj parazita/ $\mu$ L
ARDS	-	akutni respiratorni distress sindrom
LDH	-	laktat dehidrogenaza
ACT	-	artemisinin-based combination therapy
RDT	-	rapid diagnostic test
PCR	-	polymerase chain reaction
SMM	-	submikroskopska malarija
Le	-	leukocit
HRP2	-	histidine-rich protein II
pLDH	-	parazitska laktat dehidrogenaza
IIF	-	indirect immunofluorescence
IHA	-	indirect hemagglutination assay
ELISA	-	enzyme linked immunosorbent assay
qPCR	-	quantitative real-time polymerase chain reaction
LAMP	-	loop-mediated isothermal amplification
QT-NASABA	-	quantitative nucleic acid sequence-based amplification
LDMS	-	laser-desorption mass spectrometry
FBS	-	cell-dyn full blood count
REED	-	rolling circle-enhanced enzyme activity detection
Tr	-	trombocit
C <sub>T</sub>	-	cycle threshold
MGBNFQ	-	minor groove binding nonfluorescent quencher

T <sub>m</sub>	-	melting temperature
X <sup>2</sup>	-	hi-kvadrat test
<i>k</i>	-	<i>kappa</i>
SPM	-	<i>status post malariam</i>
E. Gvineja	-	Ekvatorijalna Gvineja
SD	-	standardna devijacija
$\bar{x}$	-	srednja vrednost
Pf	-	<i>Plasmodium falciparum</i>
Pv	-	<i>Plasmodium vivax</i>
Po	-	<i>Plasmodium ovale</i>
Pm	-	<i>Plasmodium malariae</i>
Coartem®	-	artemetar + lumefantrin
Artequin®	-	artesunat + meflokin
Co-arinate®	-	artesunat-sulfametokspirazin/pirimetamin
<i>St. febrilis</i>	-	<i>status febrilis</i>
<i>Obs</i>	-	<i>observatio</i>
PPV	-	pozitivna prediktivna vrednost
NPV	-	negativna prediktivna vrednost
IP	-	interval poverenja
DNK-nemija	-	dužina registrovanja DNK
CDC	-	Centers for Disease Control and Prevention
CLSI	-	Clinical and Laboratory Standards Institute
SBET	-	stand-by emergency treatment
ctib	-	citohrom b gen
<i>Poc</i>	-	<i>Plasmodium ovale curtisi</i>
<i>Pow</i>	-	<i>Plasmodium ovale wallikeri</i>
SSUrRNA	-	small subunit ribosomal RNA
CRP	-	C - reaktivni protein

## ***BIOGRAFIJA***

## BIOGRAFIJA

Mr sc. vet. Zorica Dakić rođena je 28. 11. 1967. god. u Beogradu, gde je završila osnovnu i srednju Medicinsku školu. Fakultet veterinarske medicine (FVM) upisala je školske 1986/87. godine a diplomirala 1996. godine sa prosečnom ocenom 8,55. Specijalističke studije iz Parazitologije i parazitskih bolesti na FVM u Beogradu upisala je 1999. godine a specijalistički rad pod nazivom "Epizootiologija i epidemiologija trihineloze na području Beograda u periodu od 1996. do 2000. godine" odbranila je 2002. godine. Magistarske studije, upisane 1997. godine na FVM, na Katedri za parazitologiju, završila je 2005. god. odbranivši magistarski rad pod nazivom "Distribucija anofeličnih komaraca i rizik od malarije na teritoriji Beograda".

Od 1992. godine, Zorica Dakić počinje da radi na poslovima medicinske sestre na Infektivnoj klinici KCS u Beogradu. Nakon položenog specijalističkog ispita, 2002. godine, prelazi u Bakteriološko-parazitološku laboratoriju iste Klinike, na radno mesto parazitologa. Od 2010. godine je šef Odseka za parazitologiju, u Službi za mikrobiologiju KCS, a iste godine izabrana je u zvanje istraživač-saradnik.

Radila je na više kliničkih odeljenja iskazujući stručnost i zainteresovanost kako za stručni tako i za istraživački rad. Njen dosadašnji naučni rad dokazuje da se radi o kvalitetnom parazitologu koja svoj praktični rad uspešno kombinuje sa istraživačkim, iz čega su proistekle i kvalitetne naučne publikacije.

Do sada je u saradnji sa drugim autorima objavila 60 bibliografskih jedinica od kojih je 10 objavljeno *in extenso*. Od radova objavljenih *in extenso* jedan je objavljen u vodećem časopisu međunarodnog značaja, jedan u istaknutom časopisu međunarodnog značaja, šest u časopisima međunarodnog značaja i dva u vodećim časopisima nacionalnog značaja. Prvi je autor jednog rada objavljenog u vodećem časopisu međunarodnog značaja, tri rada u časopisima međunarodnog značaja i dva u vodećim časopisima nacionalnog značaja.

Kao istraživač-saradnik angažovana je na projektu III41019 "Kontrola infekcija apikompleksnim patogenima: od novih mesta delovanja leka do predikcije" MNTR.

## ***IZJAVA O AUTORSTVU***



Prilog 1.

## Izjava o autorstvu

Potpisani-a Zorica Dakić

broj upisa \_\_\_\_\_

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

"Značaj molekularne dijagnostike u evaluaciji kliničkog toka i ishoda malarije"

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 20. 04. 2015.

Zorica Dakić

Prilog 2.

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Zorica Dakić

Broj upisa \_\_\_\_\_

Studijski program \_\_\_\_\_

Naslov rada "Značaj molekularne dijagnostike u evaluaciji kliničkog toka i ishoda  
malarije"

Mentor Prof. dr Milorad Pavlović

Potpisani Zorica Dakić

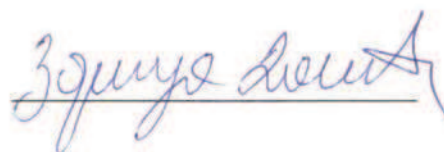
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 20. 04. 2015.



**Prilog 3.**

## **Izjava o korišćenju**

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

"Značaj molekularne dijagnostike u evaluaciji kliničkog toka i ishoda malarije"

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo

2. Autorstvo - nekomercijalno

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima

5. Autorstvo – bez prerade

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 20. 04. 2015.

