



Högskolan Kristianstad

Malaria

*En jämförande studie om diagnosticeringsmetoder. Vilken metod
passar bäst utifrån miljö, samhälle och framtid?*

Författare: Alice Nilsson

Vetenskapliga teorier och metoder i
biomedicinsk laboratorievetenskap.

BL461M, HT 2015

Kursansvarig: Fariba Vaziri-Sani

2016-01-13

Abstract

Malaria is a parasitic disease known worldwide. In 2015 the disease caused 438000 deaths of which 90% occurred in the African region.

The parasites destroy the erythrocytes in the human body and are transmitted by the *Anopheles* mosquitoes. There are five species of the genus *Plasmodium* that causes malaria. The species *P. falciparum* causes the most deaths and therefore most diagnostics are about detecting this species.

Malaria occurs approximately a week after the infecting bite. The symptoms are often varying and nonspecific and hence complicate the diagnosis of the disease.

Thick and thin blood film microscopy examination (Peripheral blood smears) is the golden standard for malaria diagnosis. However, to be able to make quicker and more reliable diagnoses new methods need to be developed. Even though there are effective drugs against malaria, delayed diagnoses and treatment are major causes of death in many countries. Knowledge and resources are primarily lacking in the endemic areas where it is needed the most. There are many criteria for a method that should be fulfilled; such as sensitivity, rapidness, accuracy and cost-effectiveness. The method needs to be easy to use in the actual environment and it has to have potential for the future. This is a comparative study of microscopy of thick and thin blood smears (PBS), quantitative buffy coat (QBC), polymerase chain reaction (PCR), cell-microarray chip, loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and rapid diagnostic tests (RDTs).

The conclusion that can be drawn from this study is that more work needs to be done before a new method can replace conventional microscopy. In the endemic areas the aspects of cost and simplicity are important to take into consideration. Among the methods in this study, The LAMP seems to be the one with the most potential if it continues to develop in the future.

Keywords: Malaria; Diagnosis; *Plasmodium*; Method

Sammanfattning

Malaria är en välkänd parasitsjukdom världen över som år 2015 ledde till 438000 dödsfall, varav 90% i den afrikanska regionen. Parasiterna förstör de humana erytrocyterna och sprids via *Anopheles*-myggor som är vektorer. Parasitsläktet som orsakar malaria kallas *Plasmodium* och består av fem arter. Orsaken bakom flest dödsfall är *P. falciparum* och därför går mycket diagnostik ut på att detektera just denna art.

Sjukdomen uppkommer cirka en vecka från det att man blivit myggbiten. Symptomen kan vara väldigt varierande vilket gör det svårt att ställa en snabb diagnos.

Effektiva läkemedel mot malariaparasiterna finns men de sätts i för många fall, in på fel sätt eller inte alls vilket beror på brister i diagnosticeringen. Kunskap och framförallt resurser saknas i endemiska områden.

Idag används mikroskopi av blodutstryk (peripheral blood smears (PBS)) som rutinmässig standard för malariadiagnostik, men för att kunna ställa tidigare och mer säkra diagnoser har nya metoder utvecklats. Det finns många kriterier som bör uppfyllas av en lyckad metod så som känslighet, snabbhet, omgivningsanpassning och en acceptabel kostnad. För att komma fram till vilken metod som passar bäst utifrån dessa aspekter samt framtidspotential jämförs i denna studie mikroskopi av tjocka och tunna blodutstryk, quantitative buffy coat (QBC), polymerase chain reaction (PCR), cell-microarray chip, loop-mediated isothermal amplification (LAMP) och rapid diagnostic tests (RDTs).

Slutsatserna som kan dras är att mer arbete behöver göras innan en ny metod helt kan ersätta konventionell mikroskopi. I de endemiska områdena är kostnaden och enkelheten väldigt betydande och därför är LAMP den metod som jag efter att alla dessa metoder ha jämförts, anses ha mest potential för att uppfylla kriterierna och skulle kunna ersätta den konventionella mikroskopin om metoden vidareutvecklas.

Nyckelord: Malaria; Malariadiagnostik; *Plasmodium*; Metod

Innehållsförteckning

1. Bakgrund	5
1.1 Definition.....	5
1.2 Livscykel	5
1.3 Patogenes och relaterade sjukdomar	5
1.4 Människans immunförsvar	6
1.5 Symptom.....	6
1.6 Behandling.....	6
1.7 Förebyggande åtgärder	6
1.8 Problem och konsekvenser	7
1.9 Detektions- och diagnosticeringsmetoder	7
1.10 Syfte/Frågeställning.....	10
2. Metod	10
3. Resultat.....	11
3.1 Artikel nummer 1	12
3.2 Artikel nummer 2	13
3.3 Artikel nummer 3	14
3.4 Artikel nummer 4	15
3.5 Statistisk data-analys	16
4. Diskussion	16
4.1 Metoddiskussion.....	17
4.2 Resultatdiskussion	18
4.2.1 Artikel nummer 1	18
4.2.2 Artikel nummer 2	19
4.2.3 Artikel nummer 3	19
4.2.4 Artikel nummer 4	20
5. Konklusion/Slutsats.....	20
Referenser.....	22
Populärvetenskaplig sammanfattning	23

1. Bakgrund

1.1 Definition

Malaria är en av världens största och mest omtalade parasitsjukdomar. Parasitinfektionen drabbar erythrocyterna i den humana kroppen och den protozoiska sjukdomen överförs via *Anopheles*-myggor som därför betraktas som vektorer (White *et al*, 2014).

Det finns fem arter inom *Plasmodium*-släktet som orsakar mänsklig malariasjukdom: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* och *Plasmodium knowlesi*. De allra flesta fallen orsakas av *Plasmodium falciparum* och *Plasmodium vivax*. *P. falciparum* är den art som orsakar i särklass flest dödsfall i världen och som därför blivit mest angelägen att kunna hitta motverkande medel emot.

Sjukdomen var en gång i tiden spridd över hela världen men har idag utgallrats ifrån Europa, USA, Kanada och Ryssland (White *et al*, 2014).

I WHO:s världsrapport för 2015 ska antalet malariafall ha minskat från 262 miljoner år 2000 till 214 miljoner 2015, vilket är en minskning på 18%. Av 2015 års fall ska hela 88% ha sitt ursprung i den afrikanska regionen. Antalet dödsfall år 2015 förmodades vara 438000 varav 90% var i den afrikanska regionen (WHO, 2015b).

1.2 Livscykel

Malaria sprids till människan genom myggbett av honor i släktet *Anopheline* som är vektorer. Vid blodsugningen sker en insprutning av rörliga sporozoiter till blodcirkulationen som förs vidare till levern där varje sporozoit angriper en hepatocyt som den förökar sig i. Efter en vecka kan upp emot 10000-30000 dottermerozoiter ha bildats inuti hepatocyten. Sporozoiterna har då utvecklats till schizonter som kommer att brista och släppa ut merozoiterna i blodet som då alla blir tillgängliga för att invadera erythrocyter i vilka de formerar en slags ringstruktur. Parasiterna fäster sig och tar sig in i erythrocyterna via olika ligand-receptor interaktioner. De förbrukar sedan erythrocytens innehåll och förändrar cellmembranets uppbyggnad så att gynnande näringsämnen kan passera membranet. Hemoglobinet bryts ned av parasiterna till en kristalliserad form som kallas hemozoin (malaria pigment) som är synligt i mikroskop. De olika arterna inom *Plasmodium* formerar något olika ringstrukturer som på så vis kan specificera arten (White *et al*, 2014).

Erythrocyterna spricker tillslut och tillväxten av parasiterna fortsätter. Detta sker enbart genom mitos (assexuell cykel) i den mänskliga kroppen. Sjukdomen malaria med dess symptom uppkommer när antalet parasiter i cirkulationen uppnår cirka 100 miljoner vilket kan ske efter ungefär en vecka. Parasiterna kommer då även vara detekterbara i mikroskop eller med diagnostiska snabbtester. Inkubationstiden beräknas vara 12-14 dagar efter själva bittet (White *et al*, 2014).

För att det ska kunna bli en sexuell förökning (meios) krävs det att några merozoiter utvecklas till gametocyter och tas upp av en ny blodsugande mygga av samma art. Väl i myggans kropp kan en reproduktion ske och oocysten som då bildas kommer att brista så att en ny generation av sporozoiter ansamlas i spottkörtlarna för att invänta nästa bett. Vid det nya bittet frigörs parasiterna och sjukdomen sprids på så sätt vidare. Den fullständiga cykeln beräknas ta ungefär en månad (White *et al*, 2014).

1.3 Patogenes och relaterade sjukdomar

Vid en infektion av *P. falciparum* uppkommer utbuktningar på erythrocytens yta vilket gör att ett slags ytprotein som fäster till ytan på endotel i vener och kapillärers pressas ut. Detta gör så att erythrocyterna börjar fästa till kärlväggarna och även till varandra vilket orsakar farliga ansamlingar av blod. Erythrocyterna bärande på mogna parasiter leds också in i organen och de blir mer sfäriska och styva vilket gör att de kan blockera kapillärer och venoler och på så sätt

förkorta deras livstid. Själva blockaderna som bildas kan även hindra erythrocyterna från att passera mjälten som är ett väldigt viktigt organ för immunförsvaret där de infekterade blodkropparna kan attackeras vilket såklart inte är bra (White *et al*, 2014).

Malaria kan orsaka allvarlig anemi, akut njurskada, lungödem, acidosis, gulsot, hypoglykemi och även cerebrala skador.

Dödligheten stiger då andelen infekterade erythrocyter överskrider 2%, vilket förstås kan vara individuellt varierande (White *et al*, 2014).

1.4 Människans immunförsvaret

Immunförsvarets försvarsmekanismer är inte fullständigt utredda och de verkar variera lite från infektion till infektion. Det är dock bekräftat att det både finns ett humoralt och ett cellulärt svar som skydd. Mjältens immunförsvaret stegras och likaså filtrationshastigheten. Fler erythrocyter än normalt avlägsnas och när schizonterna spricker och cellulärt innehåll läcker ut svarar kroppen genom att aktivera monocyter och makrofager. Frisättning av cytokiner påbörjas och på så vis uppkommer feber och andra patologiska effekter (White *et al*, 2014).

I vissa områden är sjukdomen så pass utbredd och dominerande så att populationen där har anpassat sig och utvecklat en immunitet mot illamående och andra symptom men inte mot själva infektionen i sig. Detta försvårar upptäckten av sjukdomen (Tangpukdee *et al*, 2009).

1.5 Symptom

De första symptomen som uppenbarar sig vid malaria kan vara väldigt ospecifika och varierande. Huvudvärk, muskelvärk, trötthet, magbesvär och oregelbunden feber är förekommande exempel. Illamående och kräkningar tilltar under tiden. Det finns även fall då levern förstoras och lätt anemi kan uppstå (White *et al*, 2014).

1.6 Behandling

Det finns idag effektiva malarialäkemedel vilket leder till att dödligheten vid en komplicerad infektion av *P. falciparum* trots allt endast är 0-1%. För denna art som är mest allvarlig har artesunat påvisats vara ett lämpligt botemedel med en lägre dödlighet än quinine (White *et al*, 2014).

En kombinationsbehandling med artemisinin rekommenderas vid en inte lika komplicerad och allvarlig malaria. Denna behandling ges under tre dagar och åstadkommer en långsam eliminering av parasiterna. Olika läkemedel och ordinationer används på de olika geografiska platserna (White *et al*, 2014).

1.7 Förebyggande åtgärder

Ett vaccin mot malaria har länge försökt blivit utarbetat och RTS (Mosquirix) är det som varit mest framgångsrikt och kommit längst. Inget är dock helt färdigutvecklat och i rutinmässig användning ännu. Istället satsas det på att med olika medel minska risken för myggbett genom bland annat vektorkontrollprogram. WHO har utvecklat en strategi för att med olika tillvägagångssätt hantera vektorerna på bästa vis. Heltäckande kläder är förstås ett viktigt skydd (White *et al*, 2014).

Specialframställda impregnerade myggnät minskade i en studie i Afrika dödligheten med 20% för barn yngre än fem år. Dessa insektsbehandlade myggnät skyddar inte bara människan från betten utan ska även döda myggorna genom gift. Resistens mot insektsdödande medel har dock utvecklats i områden där det varit en omfattande användning vilket måste beaktas. Det finns även insektsdödande spray som kan användas inomhus. Effekten beror förstås mycket på myggornas levnadssätt i just den omgivningen. Den mänskliga exponeringen och miljöexponeringen av medlet måste också uppmärksammas (White *et al*, 2014).

Dagens globala resande och emigrerande från endemiska områden har lett till att antalet fall har ökat i utvecklingsländerna. Kemoprophylax erbjuds idag till resenärer som ska besöka endemiska områden. Det är inte fullständigt tillförlitligt men har en god förebyggande effekt (White *et al*, 2014).

1.8 Problem och konsekvenser

Malariasymptom överlappar i många fall med symptom för andra tropiska sjukdomar vilket gör det svårare att diagnosticera sjukdomen i tid och sätta in rätt läkemedel. Malaria är en sjukdom som kräver omgående behandling. I många länder leder förseningar av diagnos idag till dödsfall. Läkemedel sätts även ibland in när det egentligen inte är malaria som orsakar symptomen. Detta kan leda till en besvärlig resistensutveckling (Tangpukdee *et al*, 2009).

1.9 Detektions- och diagnosticeringsmetoder

Malariadiagnostik har länge utgjorts av att identifiera malaraparasiter, antikroppar eller specifika produkter i blod från patienten. Detta må vara relativt enkelt men det finns svårigheter som inte får underskattas. Det finns fem olika arter och att kunna särskilja dessa är viktigt för bland annat behandling. Arterna har olika mognadssteg, olika verkan och symptom, framkallar olika effekter från immunförsvaret och är resistenta mot olika läkemedel. Diagnosticeringen är väldigt viktig för att rätt behandling ska kunna sättas in omgående och på så vis minska risken för allvarliga följder (Tangpukdee *et al*, 2009).

Det finns idag ett flertal olika detektionsmetoder för att kunna identifiera *Plasmodium* och ställa en diagnos och utvecklingen av dessa metoder fortskrider.

Mikroskopi

Mikroskopi av tjocka och tunna blodutstryk har funnits i mer än ett sekel och kvarstår fortfarande som "the golden standard". Vissa förbättringar och förfiningar har gjorts men grunderna är samma. Perifert blod tas ifrån patientens desinfekterade finger och stryks ut på ett glas. Blodet får torka och färgas sedan in med vanligtvis Giemsa, Wright's eller Field's färgning. Överflödet av färgen tvättas bort och preparatet får sedan torka innan det kan analyseras och bedömas i ett ljusmikroskop (Tangpukdee *et al*, 2009).

Det tjocka blodutstryket används för att se om parasiter finns närvarande medan det tunna blodutstryket är lämpligt för att kunna artbestämma eventuella parasiter (Tangpukdee *et al*, 2009).

Quantitative Buffy Coat (QBC)

För att utveckla ovanstående metod med ljusmikroskopi och förstärka den uppfördes QBC. Metoden går ut på att med fluorescerande färg, acridineorange, färga in malariaparasiternas DNA så att detektionen blir tydligare. Blod samlas upp i ett mikro-hematocrit rör innehållande antikoagulerande ämnen och acridineorange. Röret behöver sedan endast centrifugeras innan det är färdigberett inför detektion med ett epi-fluorescencemikroskop. Om malariaparasiter finns närvarande i provet kommer deras cellkärnor fluorescera i en ljusgrönfärg mot en orange cytoplasma (Tangpukdee *et al*, 2009).

På marknaden finns det idag även portabla mikroskop baserade på en lysdiodsteknik utrustade med förberedda glas med fluorescerande reagens (Tangpukdee *et al*, 2009).

Rapid diagnostic tests (RDTs)

Denna grupp bestående av snabbdiagnostiska tester skiljer sig från de två ovanstående metoderna på så sätt att detektionen går ut på att påvisa antigen mot malaria genom immunokromatografi. Detta åstadkoms genom att låta blod med dess eventuella malaria-

antigen flöda genom ett membran täckt med färginmärkta specifika antikroppar. Om antigen finns närvarande i blodet så fångas dessa upp av specifika primära antikroppar och detta komplex binder i sin tur in till färginmärkta sekundära antikroppar som bildar ett synligt band på en strip. I varje test finns också en kontrollinje för att bekräfta den tekniska kvaliteten i testet (WHO, 2015a).

Det finns olika test med olika antikroppar som riktar sig mot de olika arterna. De allra flesta testen är utformade för detektion av *P. falciparum* och då används till exempel antikroppar riktade mot laktatdehydrogenas (LDH) eller histidin-rikt protein II (HRP-II).

Det finns även test som är konstruerade för att kunna skilja på om infektionen är orsakad av en art som är icke- *P. falciparum* eller om det är en mixad infektion (Tangpukdee *et al*, 2009).

Polymerase chain reaction (PCR)

PCR har lett till en väldigt stor utveckling inom molekylärbiologin och tekniken har även testats inom malariadiagnostik. Metoden går ut på att bl.a. amplifiera parasiternas nukleinsyror för att lättare kunna detektera låga nivåer. Detta görs med hjälp av sekvensspecifika primers, Taq-polymeras, dNTPs, buffert och magnesiumklorid och resulterar i att primers kan binda in och amplifiera den utvalda sekvensen genom olika temperaturberoende steg som körs i flera cykler. Detektionen kan sedan ske med hjälp av bland annat gelelektrofores där de framställda fragmenten som färgats in vandrar en specifik sträcka beroende på deras antal baspar, det vill säga storlek. Banden jämförs sedan med en storleksmarkör som också fått vandra i gelen. Gelerna kan när körningen är klar belysas med UV-strålning och fotograferas för att kunna bedömas (Morassin *et al*, 2002).

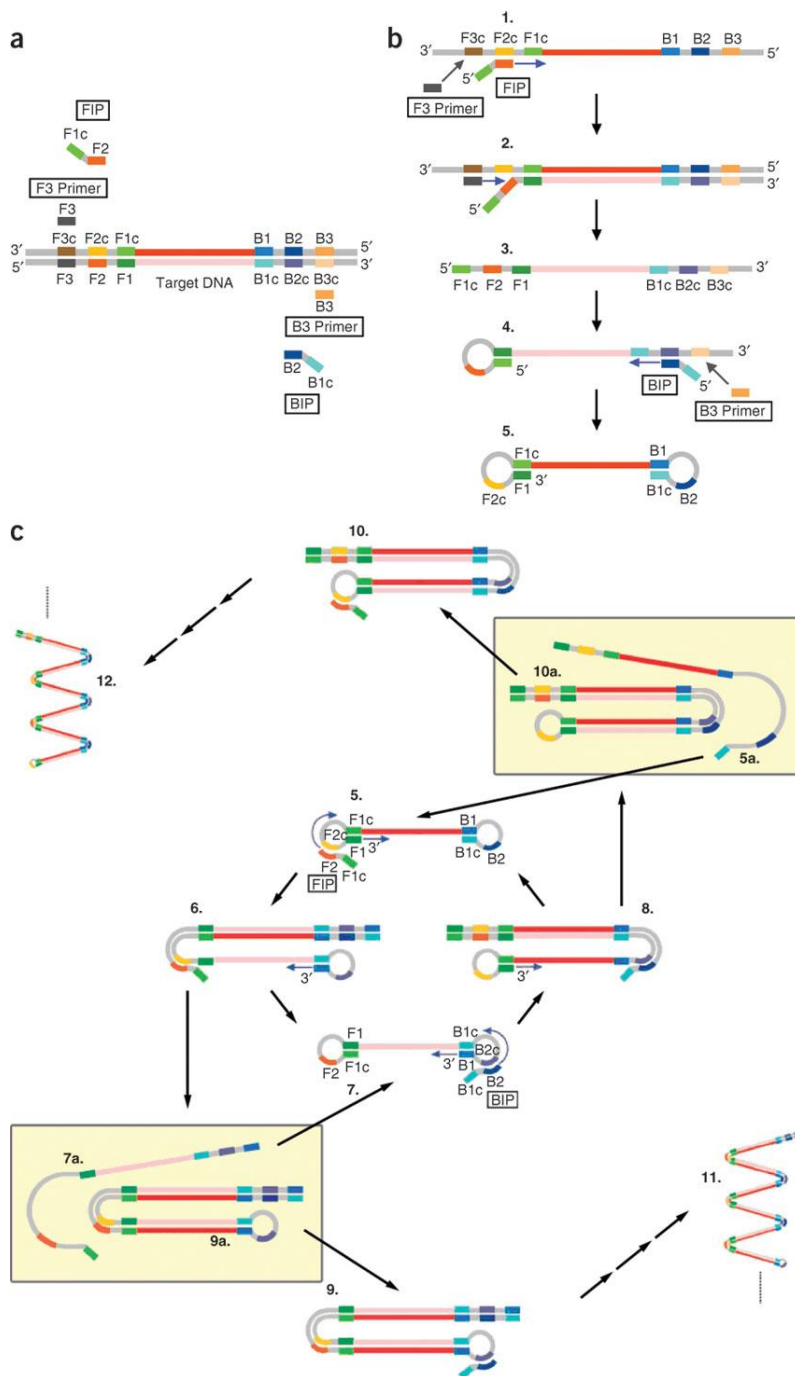
Det har även kommit flera varianter av PCR, däribland nested-PCR som har skapats för att minska icke-specifika inbindningar. Denna metod använder två uppsättningar av primers varav den andra uppsättningen är avsedd för att amplifiera en utvald sekvens som bildats som produkt i den första körningen (Poschl *et al*, 2010).

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

LAMP-tekniken har slagit igenom på senare år och är ett enkelt och relativt billigt molekylärbiologiskt test. Vanligast är testet som går ut på att detektera den konserverade formen av 18S-ribosom-RNA-genen som finns hos *P. falciparum*, men det finns även varianter som kan detektera de andra arterna (Tangpukdee *et al*, 2009).

Proceduren går ut på att amplifiera nukleinsyra med en konstant temperatur, cirka 65°C vilket skiljer LAMP ifrån vanlig PCR. En termisk denaturering av det dubbelsträngade DNAt behövs inte utan strängarna separeras i detta fall utav primers. Med hjälp av minst fyra olika set primers som har sex olika igenkänningssekvenser på genen blir DNAt amplifierat genom att det kontinuerligt skapas loopar likt öglor. Det blir en automatisk cykel och olika steg och temperaturer behövs på så sätt inte. Det finns två inre primers och två yttre. I början används alla primers men senare i cykeln är det bara de två inre som används. Den slutliga produkten blir en lång slinga av kopior av den utvalda DNA-sekvensen enligt figur 1 (Notomi *et al*, 2000).

Själva detektionen av produkterna som bildats vid amplifiering kan göras med olika sätt. Vanligtvis analyseras grumligheten i provet. Ju mer produkt som bildas desto mer magnesiumpyrofosfat fälls ut i lösningen som en detekterbar biprodukt (Notomi *et al*, 2000).



Figur 1. Amplifieringsprincip för LAMP (Norihiro *et al*, 2008).

Microarray

Genomet för *Plasmodium* är idag kartlagt och publicerat vilket leder till fler molekylärdiagnostiska möjligheter. Microarray-tekniken är en av dem och denna metod kan komma att spela en stor roll för malariadiagnostik i framtiden.

Microarray baseras på hybridisering och är väldigt likt Southern-hybridisering. Utvalda sekvenser i nukleinsyran kan med hjälp av prober hybridiseras till en enda matrix. Flera gener kan alltså detekteras i ett enda försök. Själva detektionen är fluorescensbaserad. Matrisen tros kunna utformas som miniatyr och även automatiseras vilket hade lett till att en stor mängd prover hade kunnat tas emot och behandlas samtidigt. Tekniken är fortfarande i ett tidigt skede av utvecklingen men i framtiden kan den säkert komma att bli lyckosam för malariadiagnostik (Tangpukdee *et al*, 2009).

1.10 Syfte/Frågeställning

Malaria är en utbredd och allvarlig sjukdom i främst de tropiska delarna av världen som år 2015 ledde till 438000 dödsfall (WHO, 2015). Det finns effektiva och botande läkemedel mot malariaparasiterna men de sätts i för många fall in försent, på fel sätt eller inte alls. Kunskap och framför allt resurser saknas i de endemiska områdena och dessa brister är ett stort hinder för en tillförlitlig och snabb diagnos. Mer effektiva och säkra diagnostiseringsmetoder med hög specificitet för de olika arterna kan troligen hjälpa till att sänka antalet dödsfall i framtiden. Därför jämförs i denna studie olika metoder att diagnosticera malaria på. Det finns många aspekter som måste övervägas vid val av metod så som känslighet, snabbhet, enkelhet och kostnad. Vilken metod passar bäst utifrån miljö och samhälle? Hur ser utvecklingen av metoder och möjligheterna i framtiden ut?

2. Metod

Litteratursökningen inleddes med ett väldigt brett urval med endast ”Malaria” som sökord i sökbasen Summon@hkr för att få en helhetsuppfattning om sjukdomen och dess innebörd. En tidsbegränsning med artiklar tidigast från år 2000 ställdes också in för att artiklarnas innehåll skulle vara någorlunda aktuellt. Flera abstracts lästes igenom och det bestämdes att rapportens originalartiklar skulle relatera till diagnostiseringsmetoder.

Via Summon@hkr letades sedan flera reviews om malaria fram och en snabb granskning av dem och deras abstracts ledde fram till två reviews som verkade vara täckande för arbetets förståelse och syfte. Dessa lästes grundligt igenom och därefter påbörjades en mer begränsad originalartikelsökning med exklusionskriterier.

För att kunna hitta användbara originalartiklar med rätt inriktning ställdes vissa kriterier in i sökbasen. Endast femton år gamla artiklar valdes och alla dessa var tvungna att vara ”peer review”, det vill säga vetenskapligt granskade av sakkunniga. Sökningarna gjordes på så sätt med ett källkritiskt perspektiv. Sökorden specificerades allt mer och mer efterhand för att kunna matcha arbetets syfte och frågeställningar.

De publicerade originalartiklarnas abstracts och titlar var till stor nytta för de slutgiltiga valen då dessa tydligt visade ändamålet. Artiklarna sorterades efter relevans och endast engelska artiklar granskades.

I de utvalda reviewerna fanns referenser till andra artiklar och tidskrifter med kopplad information. På detta vis upptäcktes WHO:s världsrapport för malaria vars statistiska innehåll var nyligen uppdaterat och var användbart i arbetets inledning.

Tabell 1. Resultat över litteraturstudie

Sökord	Sökmotor	Begränsning	Antal funna	Antal lästa abstracts	Antal använda
Malaria	Summon@hkr	Fulltext online >2005	178 767	6	-
Malaria review	Summon@hkr	Fulltext online >2005	52 612	6	1
Malaria diagnosis	Summon@hkr	Peer review Fulltext online >2000	28070	3	1
Malaria PCR	Summon@hkr	Peer review Fulltext online >2000	17 627	3	1
Malaria microarrays	Summon@hkr	Peer review Fulltext online >2005	3444	2	1
Malaria QBC	Summon@hkr	Peer review Fulltext online >2005	157	4	1

Malaria blood smears	Summon@hkr	Peer review Fulltext online >2005	6384	4	-
Malaria LAMP	Summon@hkr	Peer review Fulltext online >2005	1083	3	1
Loop-mediated isothermal amplification of DNA	Summon@hkr	Fulltext online	2580	2	1
Malaria WHO	Google	-	3950000 0	2	2

3. Resultat

En sammanfattning av fyra originalartiklar, dess syfte, metodbeskrivning och viktigaste resultat presenteras i tabell 2.

Tabell 2. Sammanfattning av vetenskapliga originalartiklar

Författare/ årtal/ tidsskrift/land	Syfte	Metod (viktigaste metoder)	Urval av material som används i varje studie	Deltagare (variant, antal, kön, ålder etc)	Resultat/vetenskaplig kvalitetsbedömning
Poschl <i>et al.</i> (2010). <i>AMERICAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE.</i> Thailand.	Jämförande studie av mikroskopi, nested-PCR och LAMP.	Mikroskopi, nested-PCR, LAMP.	Humana blodprover.	Patienter och blodgivare, 130 blodprov, både friska och sjuka. Från mer än 10 sjukhus i norra Thailand. Troligen båda könen och i alla åldrar. April-maj 2008.	LAMP är en känslig och relativt enkel metod som kan spela en stor roll i framtiden. Den är inte lika dyr och krävande som nPCR och är mer känslig än konventionell mikroskopi. Studien varade under en kortare tid med relativt få prover och kan därför inte betecknas som heltäckande.
Sandhya <i>et al.</i> (2012). <i>International Journal of Collaborative Research on Internal Medicine & Public Health.</i> Indien.	Jämförande av mikroskopi av blodutstryk, QBC och RDT som malariadiagn ostiska metoder.	Mikroskopi av blodutstryk, QBC och RDTs.	Humana blodprover.	Patienter, 500 blodprover från ett regionsjukhus i Indien från december 2008 till maj 2010. Båda könen. Störst andel i åldern 21-30 år.	RDTs kan passa bra för screening ute i fältmiljö men testerna är inte så känsliga. QBC hade en högre känslighet för låg parasitemi än tunna blodutstryk men gav även falskpositiva och falsknegativa resultat. Båda dessa metoder är ganska dyra i förhållande till mikroskopi av blodutstryk. QBC och RDTs kan tänkas användas då expertis eller utrustning för mikroskopi inte finns tillgänglig. Studien är heltäckande med ett stort antal prover.

Yatsushiro <i>et al.</i> (2010). <i>PLOS ONE</i> . Japan.	Att utvärdera cell-microarray chip's förmåga att detektera malariainfekt erade erythrocyter.	Cell-microarray chip.	Framrenade erythrocyter. Kultur av <i>P. falciparum</i> stam som odlats fram.	Inga riktiga patientprover användes utan prover framställdes av forskargruppen.	Cell-microarray chip kan vara 10-100 gånger känsligare än ljusmikroskopi och väldigt låga nivåer av malariaparasiter kan detekteras. Från det att framrenade erythrocyter finns tillhanda tar detektionen endast ca 15min. Dock är det en dyr metod och de olika arterna kan ännu inte urskiljas. Metoden behöver testas på riktiga patientprover för att få pålitliga resultat.
Morassin <i>et al.</i> (2002). <i>American Journal of Tropical Medicine and Hygiene</i> . Frankrike.	PCR testades för rutinmässig malariadiagn ostik. En jämförelse med QBC gjordes.	PCR, QBC och mikroskopi.	Humana blodprover.	529 patienter, 59,2% män och 40,8% kvinnor. Åldersspann: 2-90 år där medelåldern var 35,7 år. Oktober 1999 till september 2000.	PCR är en känslig metod som lämpar sig bättre än QBC och mikroskopi vid artbestämning. Den komplexa utrustningen, kostnaden och risken för kontaminering förstör i dagsläget möjligheten för rutinmässig användning.

3.1 Comparative Diagnosis of Malaria Infections by Microscopy, Nested PCR, and LAMP in Northern Thailand (Poschl *et al.*, 2010).

Tre olika diagnostiska metoder för malaria jämfördes år 2008 i en studie (Poschl *et al.*, 2010). Metoderna var mikroskopi av blodutstryk, nested polymerase chain reaction (nPCR) och loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Provmaterialet utgjordes av blodprov från 105 patienter som samlats in ifrån mer än tio olika sjukhus i norra Thailand och 25 blodprov ifrån en blodbank. 65 av patienterna hade en positiv malariadiagnos efter mikroskopi, 13 patienter hade misstänkt malaria men negativ mikroskopi, 2 patienter var behandlade för malaria och 25 patienter hade feber av okänd anledning och atypiska malariasymptom.

nPCR användes som referensstandard för detektion av *P. falciparum*. 57 positiva resultat för *P. falciparum* detekterades. Av dessa detekterade mikroskopi och LAMP 48 positiva var medan nPCR gav 53 positiva svar. Resultaten sammanställdes tillsammans till 57 positiva svar. McNemar's X^2 test visade inte någon signifikant skillnad i noggrannhet mellan de tre metoderna.

Ett jämförande av känslighet och specificitet mellan de tre metoderna gjordes också. Som referens för känslighet och specificitet användes en sammanställning av varje provresultat där minst två av de tre metoderna gav samma svar. Av 48 positiva prov detekterade mikroskopi 44 av dem medan både LAMP och nPCR detekterade samtliga. Alla negativa prover, 57st, var samtliga negativa för detektion med LAMP. För nPCR påträffades dock 5 falskpositiva prover i första körningen (därefter negativa i andra och tredje körningen). Enligt mikroskopi så var fyra av proverna positiva och alltså var dessa troligen falskpositiva. Känsligheten för mikroskopi var således 92% och 100% för de andra två metoderna.

99% av resultaten från analysen med LAMP överensstämde med resultaten från nPCR.

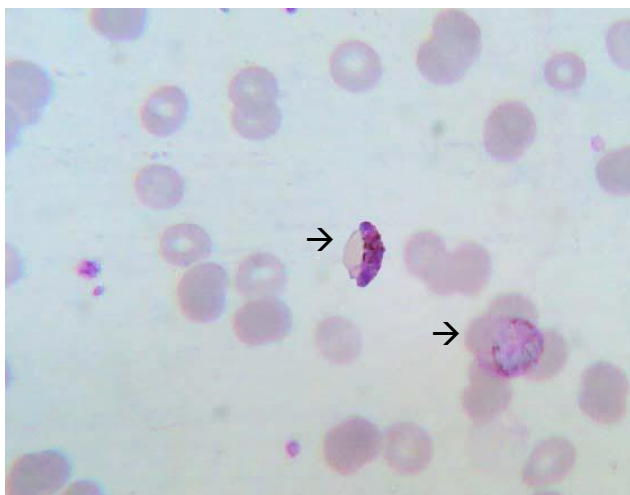
3.2 Laboratory diagnosis of malaria by conventional peripheral blood smear examination with Quantitative Buffy Coat (QBC) and Rapid Diagnostic Tests (RDT) - A comparative study (Sandhya *et al*, 2012).

I studien (Sandhya *et al*, 2012) samlades 500 blodprover in ifrån patienter med misstänkta malariainfektioner på ett regionsjukhus i Indien mellan 2008 och 2010. Som diagnosticeringsmetoder användes Leishman's färgning av tunna och tjocka blodutstryk enligt figur 2, QBC enligt figur 3 och RDTs för HRP-II antigen detektion enligt figur 4 och pLDH detektion.

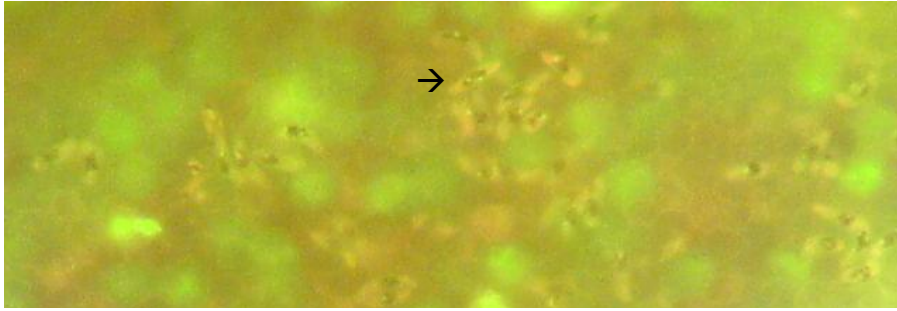
Den största patientgruppen var i åldern 21-30 år (28,2%) och förhållandet mellan andelen män och kvinnor var 1,45:1. Av de 500 proverna resulterade mikroskopin av tjocka blodutstryk i 66 positiva svar (13,2%). De tjocka blodutstryken användes även som referensstandard för jämförelse mot de andra metoderna. De tunna blodutstryken resulterade i 12% positiva svar av de 500 proverna varav 6,6% var positiva för *P. falciparum*, 4,6% positiva för *P. vivax* och 0,8% bedömdes vara mixade infektioner. QBC resulterade i 12,8% positiva prover varav 7% för *P. falciparum*, 5% för *P. vivax* och 0,8% för mixade infektioner. RDT med detektion av HRP-II antigen för *P. falciparum* resulterade i 7,4% positiva prover. 12,6% av fallen bedömdes som positiva genom RDT med detektion av pLDH och 7% av dessa bedömdes vara orsakade av infektioner med *P. falciparum* som ensam art.

Till den statistiska analysen med beskrivande statistik användes medelvärde och standardavvikelse. Chi-två-test och Fisher exact test användes för att undersöka signifikans med 95% konfidensintervall.

I studien bedömdes med QBC tre positiva prover felaktigt som negativa. Även ett falskpositivt resultat för *P. falciparum* upptäcktes och ett prov bedömdes felaktigt som *P. falciparum* när det egentligen var *P. vivax*.



Figur 2. *P. falciparum* och *P. vivax* detekterades med Leishmans's färgning med PBS (Sandhya *et al*, 2012).



Figur 3. *P. falciparum* detekterades med QBC (Sandhya *et al*, 2012).

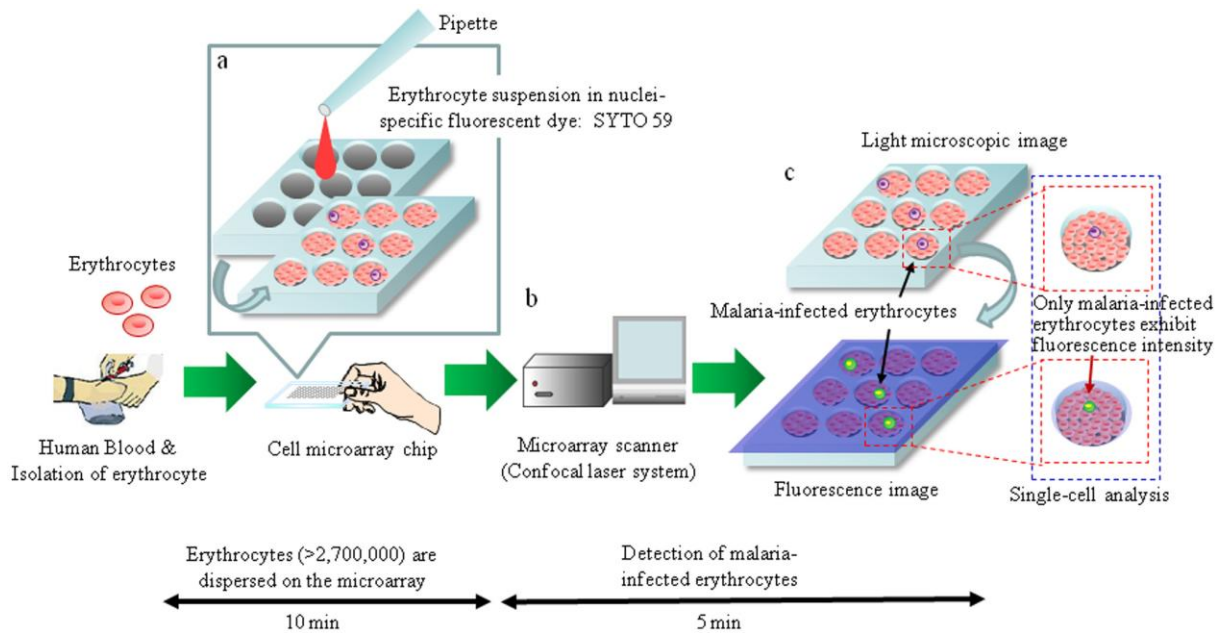


Figur 4. *P. falciparum* detekterades med RDT för detektion av HRP-II antigen (Sandhya *et al*, 2012).

3.3 Rapid and Highly Sensitive Detection of Malaria-Infected Erythrocytes Using a Cell Microarray Chip (Yatsushiro *et al*, 2010).

I en studie (Yatsushiro *et al*, 2010) testades ett cell-microarray chip's förmåga att snabbt och med hög känslighet detektera malariainfekterade röda blodkroppar. Cell-microarray chipet innehöll över 20000 mikrobrunnar som alla var spårbara. Provmaterialet bestod av olika spädningar av framrenade erythrocyter som blandats och blivit infekterade av olika mängder av en framodlad kultur av *P. falciparum*. Erythrocytsuspensionen blandades sedan med en fluorescerande kärnfärgning som fäste till de malariainfekterade blodkropparna. Detektionen som var baserad på fluorescens kunde ske eftersom röda blodkroppar vanligtvis inte har någon cellkärna. Resultatet lästes av med en scanner i form av en laser som detekterar fluorescenspositiva kärnor i erythrocyterna. Analysens händelsekedja förklaras i figur 5.

De positiva malariaerythrocyterna bekräftades med en Giemsa-färgning. Antalet fluorescenspositiva erythrocyter bestämdes för varje prov genom fem olika mätningar och resultatet uttrycktes som medelvärdet \pm standardfelet. Antalet erythrocyter per mikrobrunn beräknades vara ca 130st vilket innebär ca 2700000 erythrocyter per cell-microarray chip. Cell-microarray chipet uppvisade 10-100 gånger högre känslighet än ljusmikroskopi med Giemsa-färgning och detektionen tog ungefär 15 minuter räknat från stadiet med framrenade erythrocyter.



Figur 5. Tillvägagångssätt för cell-microarray chip (Yatsushiro *et al*, 2010).

3.4 One year's experience with the polymerase chain reaction as a routine method for the diagnosis of imported malaria (Morassin *et al*, 2002).

Under ett års tid testades PCR som rutinmässig metod för malariadiagnostik i Frankrike (Morassin *et al*, 2002). 529 patienter från Universitetssjukhuset i Toulouse med misstänkt malaria testades i studien som varade mellan oktober 1999 till september 2002. 59,2% av patienterna var män och 40,8% var kvinnor, alla i åldrarna mellan 2-90 år där medelåldern var 35,7 år.

Malariadiagnostik med PCR jämfördes med QBC och konventionell mikroskopi.

För att kunna utföra en PCR utfördes först DNA-extraktion. Två olika set med sekvensspecifika primers användes sedan till en första analys i en PCR för att kunna detektera släktet *Plasmodium* eller arten *P. falciparum* samtidigt. Positiva kontroller och storleksmarkörer användes för diagnostik i en gelelektrofores. Resultaten från detektionen med PCR kunde presenteras efter en analysprocess som tog sex timmar.

För varje prov som visade positivt för *Plasmodium* men inte för *P. falciparum* gjordes senare ytterligare PCRs för att detektera specifika sekvenser för *P. malariae*, *P. ovale* och för *P. vivax*. Genom detta arbetssätt kunde även mixade infektioner identifieras.

Sekvensering gjordes även av vissa prover för att kontrollera artbestämningens korrekthet och DNAs kvalitet då bedömningen mellan PCR och mikroskopin inte stämde överens. PCR produkten jämfördes med genbankens data.

PCR detekterade 32 positiva malariainfektioner som QBC och konventionell mikroskopi svarade ut som negativa. PCR kan alltså ha haft en högre känslighet än de andra eller så kan resultaten ha varit falskpositiva. Dock kunde sekvenseringen bekräfta förekomsten av *Plasmodium* DNA i dessa prover.

McNemar's X^2 test gav ett P-värde som var <0.0001 .

Två prover var positiva för QBC och PCR men inte vid diagnostik med mikroskopi. Det fanns inga resultat som var negativa för PCR men positiva för QBC eller mikroskopi.

Varje positivt prov kördes om i en ny PCR för att minska risken för falskpositiva resultat.

När det gällde artbestämning så skiljde sig PCR och mikroskopi åt för *P. vivax* och *P. ovale* infektioner som båda är mindre vanliga arter.

Negativa kontroller kördes också för att med största sannolikhet kunna utesluta kontaminering som felkälla.

3.5 Statistisk data-analys

I Indien, Tumkur, jämfördes mellan 2008 och 2010 olika metoder för malariadiagnostik (Sandhya *et al*, 2012). 500 patienter med misstänkt malaria lämnade blodprov till olika detektionsmetoder på regionsjukhus. Åldersgruppen med flest patienter var 21-30år och andelen män var större än andelen kvinnor. Metodernas resultat jämfördes med resultaten för mikroskopin av de tjocka blodutstryken som användes som standard. Beskrivande statistik gjordes över resultaten och presenterades som medelvärde \pm standardavvikelsen. Känsligheten talade om hur stor andel av proverna som bedömdes som positiva i förhållande till standardens bedömning. Resultaten över dessa mätningar angavs i % (Figur 6). Specificiteten beskrev hur väl artbestämningarnas resultat mellan de två grupperna stämde överens. PPV och NPV var proportionerna av positiva och negativa resultat i de diagnostiska testen som var "sant positiva" och "sant negativa" i förhållande till standarden. Värden <100 i denna kategori tyder alltså på falsknegativa eller falskpositiva resultat när en jämförelse mot standarden görs. Noggrannheten stod för skillnaden mellan det sanna värdet och det uppmätta värdet. Chi-två-test/ Fishers exakta test användes för att jämföra procentuella fördelningar mellan grupperna. De observerade värdena och de förväntade värdena mellan de olika grupperna testades. 95% konfidensintervall användes och i alla test var p-värdet mindre än 0,0001 vilket tydde på att det var statistiskt signifikant. Risken för att det i dessa fall var fel att förkasta nollhypotesen var mindre än 5%. Varken hypotesen eller nollhypotesen var rubricerade i studien.

Table 1: Comparison of Thin blood smear examination, QBC, HRP-II and pLDH antigen test taking Thick blood smear examination as gold standard

Tests	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	Accuracy	P value
Thin blood smear examination	90.91	100.00	100.00	98.64	98.60	<0.001**
QBC examination	96.92	99.77	98.43	99.54	99.60	<0.001**
HRP -II antigen detection (paracheck Pf)	56.06	100.00	100.00	93.74	94.20	<0.001**
pLDH antigen detection (SD BIOLINE)	95.45	100.00	100.00	99.31	99.40	<0.001**

PPV- Positive predictive value,

NPV- Negative predictive value

** Statistically significant

Figur 6. Statistisk tabell över jämförande metoder för malariadiagnostik (Sandhya *et al*, 2012).

4. Diskussion

Olika metoder för diagnostik av malaria har i fyra olika studier testats. Tre av dessa var komparativa, det vill säga att två eller fler metoder jämfördes i dessa studier (Poschl *et al*, 2010; Sandhya *et al*, 2012; Morassin *et al*, 2002). Dessa tre studier använde sig även av riktiga patientprover medan den fjärde studien (Yatsushiro *et al*, 2010) använde provmaterial som framställdes av forskargruppen. Mikroskopi av blodutstryk är den referensstandard som används i världen idag och studierna gick ut på att jämföra andra metoder mot denna eftersom den har vissa nackdelar som vill bemästras. Dess låga kostnad har de andra metoderna svårt att matcha och det krävs ytterligare arbete för att hitta den kompletta metoden som ska kunna användas globalt. Metoderna som jämfördes var: mikroskopi av tjocka och tunna blodutstryk,

QBC, PCR, cell-microarray chip, LAMP och RDTs. Utifrån resultaten från de fyra vetenskapliga studierna har författaren av detta arbete gjort en bedömning av metoderna som har sammanställts i en tabell (Tabell 3).

Tabell 3. Jämförelse av 6 olika metoder för malariadiagnostik.

	Mikroskopi PBS	QBC	RDTs	LAMP	PCR	Cell-microarray chip
Känslighet	Beror på tekniken på utförandet och mikroskopistens tolkningsförmåga	Oftast bättre än mikroskopi	Medel om nivån >100/µl	Mycket hög	Mycket hög	Mycket hög
Specificitet	Beror på tekniken på utförandet och mikroskopistens tolkningsförmåga	Låg	Olika beroende på test	Mycket hög	Mycket hög	Inga resultat
Tid (min)	30-60	30	20	60	60-360	60
Detektionsgräns (parasiter/µl)	Varierande, 5-50	>5	50-100	5	1	1-5
Kostnad	Låg	Medel	Medel	Medel	Hög	Hög
Kunskapskrav	Hög	Medel	Låg	Medel	Hög	Hög

4.1 Metoddiskussion

Tre av de fyra artiklarna som har använts och dess innehåll var ganska lika på det sätt att de var komparativa mellan flera olika metoder vilket anses vara positivt då de gav flera olika synsätt och aspekter till detta arbete. Nackdelarna och fördelarna för varje metod belystes och förtydligades vilket var till stor nytta för att öka kunskapen om dessa metoder. Det hade varit svårare att få fram metodernas nackdelar om bara artiklar som undersökte en metod hade valts ut eftersom det som oftast beskrivs är framförallt de lyckade delarna av studien.

Det är svårt att direkt hitta studier som besvarar det syfte och frågeställningar som arbetet inriktar sig på. Artiklarna granskades snabbt i början och de verkade att vara tillfredsställande med hänsyn till arbetets ändamål.

Det var viktigt att göra en specifik litteratursökning samt att använda fler inklusions- eller exklusionskriterier speciellt med tanke på att det fanns väldigt många artiklar publicerade i förhållande till de få artiklar som skulle användas. Båda två review-artiklar gav mycket användbar information. Att använda WHO:s världsrapport som en tillförlitlig källa gav samtidigt färsk statistik och information om ämnet i fråga.

Nackdelar med dessa utvalda artiklar var dess statistiska data som inte demonstrerades eller presenterades på ett tydligt sätt med hjälp av figurer eller tabeller. Hypoteserna beskrevs inte på ett lätt förståeligt sätt. Den fjärde artikeln av Morassin *et al.* (2002) var publicerade för fjorton år sedan men det har hänt mycket sedan dess inom utvecklingen av PCR metoden. Så resultaten speglar möjligtvis inte de resultat som hade kunnat fås av en nyare studie vilket gör att författarens bedömning av denna metod kanske inte är rättvis.

De andra studierna var nyare men eftersom malaria är så pass aktuellt och så mycket sker i utvecklingen på kort tid hade det varit bättre att hitta fler nya studier med mer aktuella och rättvisande resultat. Det hade också varit en fördel att kunna hitta en artikel om en studie som utförts i ett endemiskt område där malaria situationen verkligen är kritisk. Resultat före och efter ny införda metoder i sådana tillstånd hade kunnat vara till stor nytta då de kanske hade kunnat bevisa hur väl en metod fungerar när de används i verkligheten. I slutet av detta arbete hittades ytterligare en studie (Cook *et al.*, 2015) där ett pilotprojekt i Zanzibar, Afrika,

utvärderades. I en fältmiljö jämfördes då LAMP med RDTs och viktiga resultat presenterades. Denna studie hade kunnat tillföra viktig information till denna litteraturstudie.

4.2 Resultatdiskussion

4.2.1 Comparative Diagnosis of Malaria Infections by Microscopy, Nested PCR, and LAMP in Northern Thailand.

Mikroskopi som är standardmetoden för malariadiagnostik har enligt en studie (Poschl *et al*, 2010) visat sig ha nackdelar som låg känslighet och specificitet, särskilt vid låg parasitemi eller efter tidigare behandling med motarbetande läkemedel mot malaria. En expert kan detektera nivåer ner till 5 parasiter/ μ l medan de flesta bedömare endast kan upptäcka en lägsta nivå på 50-100 parasiter/ μ l. På så sätt kan infektionerna underskattas vilket kan leda till att patienterna inte får den behandling som krävs. Det är svårt att med denna metod upptäcka en infektion innan symptomen uppkommit eftersom nivån av parasiter kan vara ganska låg då vilket kan ge en försenad diagnos. Metoden innebär även ett tidskrävande och intensivt arbete som skall utföras av välutbildad och erfaren personal för att få tillförlitliga resultat. Kompetens krävs alltså och det är inte lätt att på alla ställen upprätthålla denna.

Vid hög belastning och genomströmning av prover kan tiden bli snål. Tolkningsproceduren kan vara ett stort problem då bedömningen görs visuellt vilket innebär att samma preparat kan tolkas olika av person till person. Ljuskroskop kräver även tillgång till elektricitet vilket inte alltid finns tillgängligt. Fördelen med metoden är att det är billigt och inte kräver någon särskilt komplex utrustning.

nPCR är enligt studien sedan tidigare känd som en av de mest känsliga metoderna. Dess nackdelar är dock att det är tidskrävande och att många olika steg behöver genomgå, till exempel DNA-isolering innan nPCR kan påbörjas. Kontaminering av proverna kan lätt ske och likaså andra typiska laboriefel vilket kan förstöra resultaten. Den komplexa utrustningen gör även metoden dyr och därför kommer den sannolikt inte att användas som ett diagnostiskt test i fattiga länder där malaria kan förekomma i stor omfattning.

LAMP kräver ingen komplicerad utrustning, är billigare och går snabbare än PCR. Det förberedande steget med DNA-isolering som görs inför en PCR krävs inte heller. Metoden utvecklas allt mer och mer och en annan fördel med LAMP är att den troligtvis även kommer att kunna användas som en kvantitativ analys på sjukhus med hjälp av en real-time turbidimeter. LAMP går till skillnad från mikroskopi troligtvis att lära ut på 1-2 dagar eftersom färdiga kit har utvecklats och finns ute på marknaden. Testet är anpassat så att så få resurser som möjligt behövs och att det är så enkelt som möjligt och ska passa i fältmiljö. Dock behöver reagenserna förvaras i kyl och ett vattenbad med konstant temperatur måste kunna tillhandahållas.

99% av resultaten i studien från analysen med LAMP överensstämde med resultaten från nPCR vilket kan betyda att LAMP är lika pålitligt som nPCR vid klinisk detektion. En nackdel med LAMP jämfört med PCR är att primerdesignen är mer komplicerad.

Något som kan ha begränsat studien är att olika färgningar av blodutstryk, Wright och Giemsa, användes på olika anläggningar. Mikroskopisternas skicklighet kan troligen även ha varit varierande och det subjektiva bedömandet kan spela en betydande roll för resultatet.

Studien gjordes på ett ganska litet urval av prover, 105st, som dessutom bara var ifrån en region i norra Thailand. Metoderna testades endast på två anläggningar och för att få tillförlitliga resultat krävs fler studier som är mer omfattande och täcker ett större geografiskt område.

De resultat som inte var konsekventa återtestades med samma villkor på ett laboratorium i Japan för verifiering vilket höjer studiens kvalitet.

4.2.2 Laboratory diagnosis of malaria by conventional peripheral blood smear examination with Quantitative Buffy Coat (QBC) and Rapid Diagnostic Tests (RDT) - A comparative study (Sandhya *et al*, 2012).

Fördelarna med QBC jämfört med blodutstryk är enligt studien (Sandhya *et al*, 2012) att det går snabbare att utföra, det är enklare att tolka och har högre känslighet för att upptäcka låg parasitemi. Dess nackdelar är att det är dyrt och kan ge falskpositiva resultat genom artefakter såsom cellrester. QBC uppvisade i den aktuella studien både falskpositiva och falsknegativa resultat vilket talar emot denna metod. Det kan även vara svårt att specificera ringstrukturer och på så vis bestämma art. Vissa ringstrukturer kan försummas genom färgning med akridinorange. Även om metoden ger en högre sensitivitet för låg parasitemi så är kostnaden högre än för ljusmikroskopimetoden och det är också en dålig metod för artbestämning. I samma studie hade RDT för detektion med HRP-II antigen låg känslighet eftersom den missade att detektera 29 positiva fall jämfört med de andra metoderna. I tre av fallen tros låg parasitemi (<100parasiter/ μ l) ha varit anledningen till försumningen och i de andra fallen var infektionerna antagligen inte orsakade av just *P. falciparum*. Detektion med HRP-II antigen test är snabbt, enkelt att utföra och kräver ingen komplex utrustning eller utbildning vilket kan vara användbart på glesbygden och vid fältförsök. Nackdelarna är dess höga kostnad och begränsande förmåga när det gäller att detektera infektioner som inte orsakats av just *P. falciparum*. Det går heller inte att kvantifiera parasiterna vilket är ett problem då det gäller att bedöma svårighetsgraden av infektionen eller att se hur väl en insatt behandling fungerar.

RDT för detektion av pLDH missade i studien tre positiva fall vilket kan bero på för låg parasitemi eller gendelationer så att pLDH antigenet inte uttryckts normalt. Patienterna kan även ha haft endast gametocyter vilka producerar mindre pLDH än parasiterna i den asexuella cykeln. pLDH detektionen utfördes med en slags mätsticka och är på så vis ett enkelt test. Dess princip liknar HRP-II antigen detektionen men fördelen är att alla fyra *Plasmodium*-arterna kan detekteras. Metoden kan även användas för att följa effekten av läkemedelsbehandling eftersom det enzym som detekteras endast produceras av levande parasiter. Nackdelarna är en hög kostnad och att känsligheten inte är tillräckligt bra för att detektera nivåer <100parasiter/ μ l. Det går inte heller att utföra kvantifiering eller att bedöma infektionens svårighetsgrad. Om RDTs ska kunna användas rutinmässigt krävs fler kvalitetskontroller för att säkerhetsställa tillförlitligheten. En fördel med studien var att bilder över resultaten inkluderades och på så vis kunde bekräftas. 500 prover från en period på 18 månader analyserades vilket borde ha gett ett heltäckande och pålitliga resultat.

4.2.3 Rapid and Highly Sensitive Detection of Malaria-Infected Erythrocytes Using a Cell Microarray Chip (Yatsushiro *et al*, 2010).

I denna studie (Yatsushiro *et al*, 2010) analyserades ett cell-microarray chip's egenskaper och förmågor. Cell-microarray chipet uppvisade 10-100 gånger högre känslighet än ljusmikroskopi med Giemsa-färgning vilket kan göra att en diagnosticering av malaria ske 2-4 dagar tidigare än med ljusmikroskopi av blodutstryk. Detektionen tog ungefär 15 minuter räknat från stadiet med framrenade erythrocyter vilket är en väldigt kort analysid. Metoden kan alltså användas för att ställa akuta diagnoser väldigt snabbt. Chipet kan vara bra för att utvärdera effekten av läkemedel riktade mot malaria eftersom känsligheten är så hög. Det är dock ännu inte möjligt att med denna metod bestämma vilken av de olika *Plasmodium* arterna det är som infekterat erythrocyterna vilket förstås är en nackdel. Ett problem som kan förekomma är att erythrocyterna kan vara kontaminerade av leukocyter. Dock ska det vara relativt enkelt att urskilja leukocyter ifrån erythrocyter genom att jämföra deras fluorescerande intensitet då leukocyternas intensitet i denna studie var fem gånger starkare än erythrocyternas

men det är ändå en felkälla. Själva chipet är billigt men att rena fram erythrocyterna från leukocyterna gör metoden ganska så dyr. Kostnaden för laser-scannern är också väldigt hög och de fluorescerande färgerna måste förvaras i -20°C vilket inte gör metoden särskilt lämplig för användande i fältmiljö. Inga riktiga patientprov analyserades i studien och därför krävs mer arbete och forskning inom detta område för att kunna förlita sig på resultaten och använda metoden i klinisk verksamhet.

4.2.4 One year's experience with the polymerase chain reaction as a routine method for the diagnosis of imported malaria (Morassin *et al*, 2002).

PCR verkar enligt studien (Morassin *et al*, 2002) vara en känslig men kostsam metod för malariadiagnostik. Av resultaten att döma fanns det falskpositiva resultat i studien då de tre metodernas resultat inte alltid var överensstämmande. Till exempel var två prover positiva för QBC och PCR men inte vid diagnostik med mikroskopi. Frågan är då vad som stämmer och vilket resultat som går att använda sig av. När det gällde artbestämning så skiljde sig PCR och mikroskopi åt för *P. vivax* och *P. ovale* infektioner som båda är ovanliga arter. Där kan troligtvis resultatet från PCR varit mer rättvisande eftersom PCR har högre specificitet. Metoden kunde inte lämna svar förrän efter 6 timmar vilket är väldigt lång tid jämfört med de andra metoderna.

Studien inkluderade 529 prover vilket kan betraktas som ett ganska omfattande och representativt underlag vilket leder till att tillförlitligheten höjs. Negativa kontroller kördes också för att med största sannolikhet kunna utesluta kontaminering som felkälla vilket höjer studiens kvalitet. Då det kan vara svårt att med optiska metoder, så som mikroskopi, identifiera parasiterna kan felaktiga bedömningar göras. PCR kan i detta sammanhang bidra med en säkrare diagnos. Vid blandinfektioner gäller samma sak då dessa annars kan vara svårbedömda. Att kunna detektera specifika sekvenser för varje art höjer specificiteten och att till exempel sätta in rätt läkemedel kan då bli enklare. Med PCR ges resultatet i form av analysdata och en subjektiv bedömning behöver på så vis inte göras. Malariadiagnostik baserad på PCR kan vara användbart när negativa resultat från de konventionella metoderna uppvisas men symptomen hos patienten kvarstår. Så låga nivåer som 1-5parasiter/ μl blod kan detekteras vilket är minst 10 gånger mindre än det genomsnittliga för mikroskopi eller RDTs. Denna höga känslighet är också väldigt användbar vid uppföljning av behandlingar. Produkterna från PCR kan även vidareanalyseras genom sekvensering och detta kan användas för att analysera utvecklingen av läkemedelsresistens vilket är mycket viktigt. En annan fördel med PCR är att metoden kan automatiseras och på så vis kan arbetet effektiviseras och en stor mängd prover analyseras. Själva PCR-tekniken utvecklas väldigt mycket i dagsläget och det måste ses som en metod som talar för framtiden. Att anpassa och optimera en PCR-metod för malariadiagnostik kan bli fullt möjligt. Nackdelarna med PCR är att det kräver komplex och framförallt dyr utrustning vilket talar emot denna typ av metod då dessa resurser inte kan tillhandahållas i särskilt många endemiska områden. Anvisningar behöver även strikt följas för att förhindra felkällor så som kontaminering. Separata rum för PCR och ett laboratorielandskap kan krävas för att lyckas med detta tillvägagångssätt. Metoden kräver utbildad och tekniskt skicklig arbetskraft och för att det ska gå att få in PCR som en rutinemässig metod för malariadiagnostik krävs dessutom regelbunden underhållning av maskinen samt kvalitetskontroller.

5. Konklusion/Slutsats

Jämförande av olika metoder för malariadiagnostik har genom en granskning av fyra olika studier och deras resultat lett fram till några gemensamma slutsatser.

För att förbättra statistiken när det gäller malaria handlar det framförallt om att lyckas minska dödsfallen i den afrikanska regionen genom säkrare och mer känsliga diagnosticeringsmetoder som kan ge tidigare diagnoser. Många av länderna i detta område är utvecklingsländer där det råder stor fattigdom vilket begränsar resurserna. Stora delar av befolkningen som drabbas kan också leva ute i glesbygden. Elektricitet kanske inte finns tillgänglig och komplex utrustning känns inte heller aktuell. Enligt dessa aspekter och utifrån jämförelse och utvärdering av dessa metoder är LAMP den metod som ska satsas på eftersom den med dess enkelhet och höga känslighet uppfyller de flesta kriterier. Metoden har därmed potential till att utvecklas ännu mer och kunna användas till både kvalitativa och kvantitativa analyser. Metoden är effektiv och tar mindre än en timme att utföra. Det är dessutom inte en lika dyr analys som metoder med PCR eller microarrays. Dessa är annars de enda metoder som kommer upp i samma känslighetsgrad som LAMP med en detektionsgräns på 5 parasiter/ μ l. Det är därför en utmaning i att få ner kostnaderna och att få metoden att bli demonstrerad och möjligtvis komma i rutinmässig användning globalt. Fler kliniska studier krävs dock för att validera genomförandet och det kliniska värdet av metoden. Att göra ett omfattande test under en längre period med LAMP som rutinmässig diagnosticeringsmetod i ett endemiskt område hade varit intressant och förhoppningsvis gett viktig vägledning inför framtiden. För att motarbeta resistensutvecklingen mot malarialäkemedel är det viktigt att artbestämning genomförs med hög specificitet så att rätt läkemedel används. För att kunna kontrollera denna utveckling lämpar sig molekylärbiologiska metoder allra bäst och därför är det viktigt med större satsning på dessa metoder även om det kan vara kostsamt. Fram tills den tidpunkt då presenteras revolutionerande resultat från flera olika stora studier kommer den konventionella mikroskopin nog att kvarstå som "the golden standard". Mikroskopins nackdelar anses vara för många och att för många liv kan gå till spillo på grund av bristerna med denna metod därför förhoppningen är att resurser och kraft kommer läggas ned på de andra metoderna för att lyckas hitta en ersättare. Potential finns definitivt och utvecklingen har kommit en bit på vägen så nu ser författaren med spänning fram emot ett stort genombrott som kan förbättra prognosen för malaria i framförallt de endemiska områdena.

Referenser

- Cook, J., Aydin-Schmidt, B., Gonzalez, I., Bell, D., Edlund, E., Nassor, M., Msellem, M., Ali, A., Abass, A., Martensson, A. & Bjorkman, A. (2015). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for point-of-care detection of asymptomatic low-density malaria parasite carriers in Zanzibar. *MALARIA JOURNAL* 14:43-43.
- Morassin, B., Fabre, R., Berry, A. & Magnaval, J. (2002). One year's experience with the polymerase chain reaction as a routine method for the diagnosis of imported malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 66:503-508.
- Norihiro, T., Yasuyoshi, S., Hidetoshi, K. & Tsugunori, N. (2008). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols* 3:877–882.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *NUCLEIC ACIDS RESEARCH* 28:I-VII.
- Poschl, B., Waneesorn, J., Thekiso, O., Chutipongvivate, S. & Panagiotis, K. (2010). Comparative Diagnosis of Malaria Infections by Microscopy, Nested PCR, and LAMP in Northern Thailand. *AMERICAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE* 83:56-60.
- Sandhya, B.K., Apurba, S.S., Nagaraj, E.R., Mannur, S. & Anand, S.S. (2012). Laboratory diagnosis of malaria by conventional peripheral blood smear examination with Quantitative Buffy Coat (QBC) and Rapid Diagnostic Tests (RDT) - A comparative study. *International Journal of Collaborative Research on Internal Medicine & Public Health* 4:1746-1755.
- Tangpukdee, N., Duangdee, C., Wilairatana, P. & Krudsood, S. (2009). Malaria Diagnosis: A Brief Review. *The Korean Journal of Parasitology* 47:93-102.
- White, N., Pukrittayakamee, S., Hien, T., Faiz, M., Mokuolu, O. & Dondorp, A. (2014). Malaria. *LANCET* 383:723-735.
- World Health Organization. (2015). *How malaria RDTs work*. www.who.int/ [2015-12-23].
- World Health Organization. (2015). *World Malaria Report 2015*. www.who.int/ [2015-12-21].
- Yatsushiro, S., Yamamura, S., Yamaguchi, Y., Shinohara, Y., Tamiya, E., Horii, T., Baba, Y. & Kataoka, M. (2010). Rapid and Highly Sensitive Detection of Malaria-Infected Erythrocytes Using a Cell Microarray Chip. *PLOS ONE* 5:1-8.

Malaria - kan någon diagnosticeringsmetod förbättra prognosen?

Malaria är en sjukdom som främst förekommer i de tropiska delarna av Afrika där väldigt många barn blir drabbade. Sjukdomen sprids genom ett myggsläkte som bär på malariaparasiterna och sprutar in dem i människans blodomlopp när de suger blod. Parasiterna förökar sig sedan i levercellerna i den mänskliga kroppen och har efter en vecka delat sig till cirka 100 miljoner parasiter. De går då till angrepp mot de röda blodkropparna vars strukturer förändras och det slutar tillslut med att cellerna brister och dess innehåll läcker ut. Sjukdomar som kan uppstå som följd av malaria är allvarlig anemi, akut njurskada, lungödem, acidosis, gulsot, hypoglykemi och även cerebrala skador [1].

Genom att mikroskopera färgade blodutstryk kan man vid en malariainfektion upptäcka strukturer som liknar ringar i de röda blodkropparna och då ställa en diagnos. Det krävs dock tekniskt skickliga arbetare som lyckas med en bra infärgning och även kan upptäcka parasiterna när de finns i en väldigt liten mängd. Denna typ av bedömning kan vara svår och även varierande från individ till individ och nu försöker man därför hitta metoder som dels är enklare för alla att utföra, men även mer känsliga och mindre tidskrävande [2].

Många av de nya metoderna baseras på molekylärbiologiska tekniker och när det gäller malaria är man då ute efter att påvisa delar av parasiternas DNA i patientens blod. Parasiternas arvsanlag kan renas fram och kopieras upp till väldigt många kopior som kan synliggöras med bland annat fluorescerande ämnen som lyser.

Det finns även metoder som utnyttjar immunförsvarets mekanismer för att kunna upptäcka en parasitinfektion. Då används till exempel färginmärkta antikroppar som

fäster till vissa av parasiternas proteiner och markerar dem så att deras närvaro kan bekräftas [2]. Ett av de största problemen med de nya metoderna är att deras kostnad är mycket högre än metoden med mikroskopi.

De kan även kräva komplicerad laborieutrustning som inte finns tillgänglig på alla ställen. Att hitta en metod som uppfyller alla kriterier och kan ersätta den traditionella metoden är förstås ett mål men vägen dit är lång och det finns många hinder som måste övervinnas.

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) är en tämligen ny metod som har försökt anpassats efter en besvärlig omgivning där enkelheten måste prioriteras, till exempel i ett fattigt område i Afrika där man inte har elektricitet eller laborieanläggningar. Det enda som behövs i denna metod är ett kit, ett vattenbad med konstant temperatur på runt 65°C och en kyl där vissa reagenser måste förvaras. Därefter är det bara att följa kitets enkla anvisningar. Beståndsdelarna i kitet sköter sedan själva reaktionen som egentligen handlar om att kopiera upp en specifik sekvens av malariaparasiternas DNA. Om malaria-DNA finns i provet kommer en för ögat synlig fällning att bildas som en biprodukt av reaktionen vilket gör att man kan se om patienten utsatts för en infektion och ställa en snabb diagnos. LAMP är dock dyrare än mikroskopi och det är en utmaning att få ner kostnaderna och att kunna få dessa kit att börja användas i kritiska områden [3].

Mer forskning och flera omfattande undersökningar med representativa prover behöver göras innan man vet om metoden helt kan ersätta mikroskopi, men potential finns och utvecklingen av metoden går dessutom framåt vilket är ett gott tecken för framtiden.

Referenser

1. White, N., Pukrittayakamee, S., Hien, T., Faiz, M., Mokuolu, O. & Dondorp, A. (2014). Malaria. *LANCET* 383:723-735.
2. Tangpukdee, N., Duangdee, C., Wilairatana, P. & Krudsood, S. (2009). Malaria Diagnosis: A Brief Review. *The Korean Journal of Parasitology* 47:93-102.
3. Poschl, B., Waneesorn, J., Thekiso, O., Chutipongvivate, S. & Panagiotis, K. (2010). Comparative Diagnosis of Malaria Infections by Microscopy, Nested PCR, and LAMP in Northern Thailand. *AMERICAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE* 83:56-60.