

## MALARIA/BABESIA

### MEDICINSK BAKGRUND

Malaria är en potentiellt dödlig sjukdom som kräver snabb diagnostik och behandling. **Vid misstanke om malaria ska infektionsläkare alltid konsulteras.**

Human malaria kan orsakas av sex olika *Plasmodium* (*P.*)-arter; *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. knowlesi* och *P. cynomolgi*. *P. falciparum*, som ofta ger svårast sjukdom, debuterar oftast 1-4v efter exponering i malariaområde. *P. vivax* och *P. ovale*-malaria har lägre mortalitet och debuterar ibland lång tid (månader-år) efter vistelse i malariaendemiskt område. Övriga arter är sällsynta där dock *P. knowlesi* kan bli allvarlig.

DNA-påvisning med LAMP-metod används för att utesluta eller påvisa malaria, men nuvarande metod/kit kan inte användas för att artbestämma *Plasmodium spp.*, fastställa parasitemigrad eller avgöra om påvisat DNA kommer från levande eller döda parasiter. Därför används metoden endast initialt vid första misstanken om malaria, och vid positivt utfall för malaria-DNA i LAMP färgas utstryk för mikroskopi av samma blodprov. DNA-påvisning rekommenderas inte heller vid uppföljning efter insatt behandling, eller för bedömning av eventuell behandlingssvikt, eftersom DNA kan kvarstå i veckor-månader efter framgångsrik behandling. För uppföljning beställs endast stryk och färgning, för mikroskopi.

*Babesia* sprids med fästingar i stora delar av världen inklusive Sverige. Patienterna utvecklar symtom veckor-månader efter ett fästingbett och får ofta influensaliknande symtom med feber, ont i kroppen och huvudvärk. Hos i övrigt friska individer läker infektionen ofta ut av sig själv, men då enstaka parasiter kan finnas kvar i blodet är det risk att överföra *Babesia* vid blodtransfusion under lång tid efter primärinfektionen. Immunsupprimerade patienter (eller de som saknar mjälte), riskerar att utveckla en livshotande sjukdom med hemolys och trombocytopeni.

### METOD/ANALYSPRINCIP

#### Malaria DNA-påvisning

Malaria DNA-påvisning utförs med Loopamp/HumaTurb C&A (Human, Tyskland), i vilken Loop-medierad isotermisk amplifiering (LAMP) som är ett alternativ till polymeras chain reaction (PCR) används. LAMP behöver ej temperaturcykler eller detektion med gel. Resultatet avläses genom Realtids-turbidimetri. De sex

målgenerna för LAMP-analysen hör till mitokondriegenomet hos malariaparasiten. I LAMP-analysen amplifieras detta DNA 109-1010 gånger på 15 – 60 min under en jämn temperatur på 65°C. Den automatiserade detektionen av amplifierade produkter är baserad på turbidimetri, där en biprodukt (calcein) vid DNA-amplifiering orsakar grumlighet.

### **Mikroskopi, utstryk och färgning**

Sex tunna utstryk och tre tjocka droppar utförs och läggs för att torka i väntan på analysresultat från HumaTurb LAMP.

Två tunna utstryk färgas så snart som möjligt i ordinarie diff-färgningsmetod (May-Grünwald Giemsa) och får ligga kvar på laboratoriemedicin bas. De används om mikroskopi krävs innan svar på DNA-påvisning, t.ex. vid dålig patient och behov av snabb diagnos. Om negativt utfall i DNA-påvisning, behöver övriga glas inte färgas, utan kan sparas ofärgade i en vecka, och därefter kasseras. Efter färgning delas glasen upp, och en uppsättning; ofärgade glas, 1 färgad tjock droppe och två tunna utstryk (dels Giemsa-färgat och dels May-Grunewaldfärgat) skickas samma dag till Klinisk mikrobiologi i Lund tillsammans med remiss och kvarvarande prov, som ska biobankas. En uppsättning färgade glas lämnas kvar på baslab på respektive ort för mikroskopi av infektionsläkare. Resultat av mikroskopi noteras i löpande journaltext av infektionsläkare, och efter mikroskopi på Klinisk mikrobiologi i Lund svaras mikroskopibedömningen ut på samma remissnummer som LAMP/DNA-analysen.

Vid upprepad analys som utfaller 'ej bedömbart' bör utstryken färgas och mikroskoperas (för att inte försena eventuell diagnos), samt nytt prov (för DNA-påvisning) efterfrågas av beställaren.

### **SVAR/TOLKNING**

*Svarsfrekvens:* För malaria-DNA: Dygnet runt alla årets dagar. Provet registreras och hanteras skyndsamt av akutlab (Laboratoriemedicin bas) i Helsingborg, Kristianstad, Malmö och Lund. Efter registrering hanteras provet så att utstryk görs direkt och DNA-analys kan utföras snarast möjligt (provet skickas vid behov i taxi till den ort som utför analysen aktuell tid på dygnet). Svarstid från provtagning kan variera från 1,5-4h.  
Mikroskopi jourtid utförs vid behov av infektionsläkare.  
Mikroskopi på klinisk mikrobiologi avseende malaria/babesia utförs dagtid måndag-fredag.

### **Svarsalternativ Malaria DNA-påvisning**

DNA från *Plasmodium spp.* PÅVISAT  
DNA från *Plasmodium spp* EJ PÅVISAT  
DNA från *Plasmodium spp* EJ BEDÖMBART

*Fasta svarscommentarer vid påvisat DNA:*

-Mikroskopi krävs för artbestämning och eventuell beräkning av parasitemigrad. Glas för mikroskopi färgas på labmedicin bas.

-Malaria bör handläggas i samråd med infektionsläkare, och är en anmälningspliktig sjukdom.

-DNA från *Plasmodium spp.* kan kvarstå i blodet en period efter framgångsrik behandling av malaria.

*Fast svarskommentar då DNA ej påvisats:*

Frånvaro av plasmodium DNA med denna metod bedöms som tillräcklig för att utesluta aktuell malaria, mikroskopibedömning krävs ej.

*Fast svarskommentar då analysen svarats ej bedömbär:*

-Analysen har inte kunnat genomföras med säkert resultat. Glas för mikroskopi färgas på labmedicin bas, och kommer att hanteras enligt lokal rutin för respektive ort. Nytt prov för DNA-påvisning rekommenderas.

*Telefonsvar:* Analysresultat för Påvisat och Ej bedömbära rings ut 24/7 av BMA på labmedicin Bas så snart som möjligt (innan färgning av glasen är klara). Om inte beställaren är infektionsenhet, rings även svar till infektionsjour på aktuell ort (nås via växel).

## **Svarsalternativ Mikroskopi, utstryk och färgning**

*Först skickas info med alternativen;*

1. Färgade utstryk finns för mikroskopi på Labmedicin bas
2. Färgade utstryk skickas enligt överenskommelse till Infektion för mikroskopi
3. Färgade utstryk skickas enligt överenskommelse för mikroskopi dagtid, nästa vardag, på Klinisk mikrobiologi

*Efter mikroskopi (av de positiva) nästkommande vardag svarsalternativ;*

Förekomst av *Plasmodium falciparum*. (Vid förekomst av *Plasmodium falciparum* besvaras parasitemigrad i % med en decimal.)

Förekomst av *Plasmodium ovale*.

Förekomst av *Plasmodium vivax*.

Förekomst av *Plasmodium malariae*.

Förekomst av *Plasmodium knowlesi*. (Vid förekomst av *Plasmodium knowlesi* besvaras parasitemigrad i % med en decimal.)

Förekomst av *Plasmodium spp.* (med kommentar om varför man inte kunnat uttala sig om art)

## ÖVRIG INFORMATION

Efter analys på Klinisk kemi kommer provet att gå med remiss till Klinisk mikrobiologi. Provet biobankas, och kan skickas för PCR av artspecifika gener eller resistensgener på begäran av avnämaren. Ring parasitavdelningen på Klinisk mikrobiologi om ytterligare analyser önskas från detta prov (046-173267).

DNA-påvisning med LAMP är betydligt känsligare än de globalt dominerande diagnostiska metoderna antigen test och mikroskopi efter Giemsa-färgning. I studier varierar den kliniska sensitiviteten för LAMP mellan 97-100% och specificiteten anges till >99%. Vi har genomfört en mindre studie (inför införandet av metoden), i vilken den jämfördes med högkänslig QPCR, och vi fick en total överensstämmelse med referensmetoden (DNA påvisades i 51 av 153 prover), vilket gav NPV och PPV på 100% i aktuellt urval. Den analytiska sensitiviteten anges av tillverkaren till 1 parasit/uL, att jämföra med mikroskopi, som har en sensitivitet mellan 20-200 parasiter/uL.

## REFERENSER

Egen validering/verifiering av metoden genomfördes 2021-2022 och finns dokumenterad i projektmapp VV174. I:\Labmedicin Skåne\Mikro-Projekt\Diagnostik o teknik\Mappar till validering verifiering\VV-0174

Relevanta publikationer;

1. WHO. *World Malaria Report 2021*. Geneva: World Health Organisation; 2021.
2. WHO. *WHO Guidelines for Malaria*. Geneva: World Health Organisation; 2022.
3. WHO. *Malaria rapid diagnostic test performance: results of WHO product testing of malaria RDTs: round 8 (2016–2018)*. Geneva: World Health Organisation; 2018.
4. WHO. *WHO Evidence Review Group on Malaria Diagnosis in Low Transmission Settings Meeting report*. Geneva: WHO; 2013.
5. Morris U, Aydin-Schmidt B. *Performance and Application of Commercially Available Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Kits in Malaria Endemic and Non-Endemic Settings*. *Diagnostics*. 2021;11(2):336.
6. Oyegoke OO, Maharaj L, Akoniyon OP, Kwoji I, Roux AT, Adewumi TS, et al. *Malaria diagnostic methods with the elimination goal in view*. *Parasitology Research*. 2022.
7. Ljolje D, Abdallah R, Lucchi NW. *Detection of malaria parasites in samples from returning US travelers using the Alethia® Malaria Plus LAMP assay*. *BMC Research Notes*. 2021;14(1).
8. Selvarajah D, Naing C, Htet NH, Mak JW. *Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) test for diagnosis of uncomplicated malaria in endemic areas: a meta-analysis of diagnostic test accuracy*. *Malaria Journal*. 2020;19(1).
9. Rypien C, Chow B, Chan WW, Church DL, Pillai DR. *Detection of Plasmodium Infection by the illumigene Malaria Assay Compared to*

- Reference Microscopy and Real-Time PCR*. Journal of Clinical Microbiology. 2017;55(10):3037-45.
10. Hartmeyer GN, Hoegh SV, Skov MN, Kemp M. *Use of Loop-Mediated Isothermal Amplification in a Resource-Saving Strategy for Primary Malaria Screening in a Non-Endemic Setting*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2019;100(3):566-71.
  11. Polley SD, González IJ, Mohamed D, Daly R, Bowers K, Watson J, et al. *Clinical Evaluation of a Loop-Mediated Amplification Kit for Diagnosis of Imported Malaria*. The Journal of Infectious Diseases. 2013;208(4):637-44.
  12. Cuadros J, Martin Ramírez A, González IJ, Ding XC, Perez Tanoira R, Rojo-Marcos G, et al. *LAMP kit for diagnosis of non-falciparum malaria in Plasmodium ovale infected patients*. Malaria Journal. 2017;16(1).
  13. Charpentier E, Benichou E, Pagès A, Chauvin P, Fillaux J, Valentin A, et al. *Performance evaluation of different strategies based on microscopy techniques, rapid diagnostic test and molecular loop-mediated isothermal amplification assay for the diagnosis of imported malaria*. Clinical Microbiology and Infection. 2020;26(1):115-21.
  14. Nolasco O, Infante B, Contreras-Mancilla J, Incardona S, Ding XC, Gamboa D, et al. *Diagnosis of Plasmodium vivax by Loop-Mediated Isothermal Amplification in Febrile Patient Samples from Loreto, Perú*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2020;103(4):1549-52.
  15. Piera KA, Aziz A, William T, Bell D, González IJ, Barber BE, et al. *Detection of Plasmodium knowlesi, Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in a co-endemic area in Malaysia*. Malaria Journal. 2017;16(1).
  16. Meridian Bioscience. Alethia Malaria and Malaria PLUS DNA Amplification Assays, User Information. Cincinnati, Ohio, USA: Meridian Bioscience; 2020.

För stryk och färgning:

1. Websida Centre for Disease Control, US GOV 2016-09-29:  
[http://www.cdc.gov/dpdx/resources/pdf/benchAids/malaria/malaria\\_staining\\_benchaid.pdf](http://www.cdc.gov/dpdx/resources/pdf/benchAids/malaria/malaria_staining_benchaid.pdf)
2. WHO: Giemsa Staining of Malaria Blood Films, Malaria Microscopy Standard Operating procedure – MM-SOP-07A  
[http://www.wpro.who.int/mvp/lab\\_quality/2096\\_oms\\_gmp\\_sop\\_07a\\_rev.pdf](http://www.wpro.who.int/mvp/lab_quality/2096_oms_gmp_sop_07a_rev.pdf)
3. Referensmetodik, Klinisk mikrobiologi: Parasitologisk diagnostik  
[http://referensmetodik.folkhalsomyndigheten.se/w/Referensmetodik:Parasitologisk\\_diagnostik](http://referensmetodik.folkhalsomyndigheten.se/w/Referensmetodik:Parasitologisk_diagnostik)