

Malarian diagnostiikka matalan ilmaantuvuuden alueilla - nykyiset ja kehitteillä olevat nukleiinihapon osoitusmenetelmät

Iiro Vene

Kirjallisuuskatsaus

Lääketieteen koulutusohjelma

Itä-Suomen yliopisto

Terveystieteiden tiedekunta

**Lääketieteen laitos/ Kliinisen
mikrobiologian yksikkö**

Tammikuu 2024

ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO, Terveystieteiden tiedekunta

Lääketieteen laitos

Lääketieteen koulutusohjelma

Iiro Vene: Malarian diagnostiikka matalan ilmaantuvuuden alueilla – nykyiset ja kehitteillä olevat nukleiinihapon osoitusmenetelmät

Opinnäytetutkielma 27 sivua

Ohjaajat: EL Heikki Ilmavirta ja EL, LT Outi Perola

Tammikuu 2024

Avainsanat: Malaria, matalan ilmaantuvuuden, diagnostiikka

Tiivistelmä

Tämän opinnäytetyön aiheena oli kuvata matalan malariailmaantuvuuden alueilla malarian laboratoriodiagnostiikassa käytetyt ja siihen kehitteillä olevat nukleiinihapon osoitustestit. Tässä katsauksessa käsiteltiin aluksi yleistä tietoa malariasta sekä sen esiintyvyydestä, leviämismekanismista, ennaltaehkäisystä, kliinisistä ilmentymistä, oireista, hoidosta ja perinteisestä laboratoriodiagnostiikasta. Katsauksessa keskityttiin käymään läpi tutkimuksia nykyisten ja kehitteillä olevien nukleiinihapon osoitustestien suorituskyvystä malarian tunnistamisessa ja parasitemia-asteen määrittämisessä matalan ilmaantuvuuden alueilla.

Tässä kirjallisuuskatsauksessa käytettiin aineistona pääasiassa PubMedistä löytyviä artikkeleja, jotka käsittelevät nukleiinihapon osoitustestien suorituskykyä malarian diagnostiikassa matalan ilmaantuvuuden alueella. Kirjallisuuskatsauksesta kävi ilmi, että nukleiinihapon osoitustestit ovat mikroskopiaan verrattuna suorituskyvyltään herkempiä malarian tunnistamisessa, eikä vääriä negatiivisia tuloksia juuri tule. Nukleiinihapon osoitustestien todettiin antavan usein positiivisia tuloksia myös malarian hoidon aikana silloinkin, kun malariaparasiitteja ei enää kyetty havaitsemaan mikroskopiolla. Katsauksesta ilmeni, että tietyillä nukleiinihapon osoitustesteillä kyettiin arvioimaan parasitemia-astetta vähintään kohtalaisen luotettavasti. Joissakin testeissä ongelmaksi ilmeni testin pitkä suoritus aika. Lisäksi yksi testeistä ei tunnistanut *P. knowlesi* -infektiota. Tieto nukleiinihapon osoitustestien suorituskyvystä useamman samanaikaisen malariaparasiittilajin aiheuttamien sekainfektioiden tunnistuksessa oli ristiriitaista. Nukleiinihapon osoitustestien positiivisen tulosten kliinisestä merkityksestä hoitovasteen arvioinnissa tarvitaan lisää tutkimusta.

UNIVERSITY OF EASTERN FINLAND, Faculty of Health Sciences

School of Medicine

Clinical Microbiology

IIRO VENE: Malaria diagnostics in low prevalence areas – current and future nucleic acid detection tests

Thesis, 29 pages

Tutors: Heikki Ilmavirta and Outi Perola

January 2024

Keywords: Malaria, non-endemic, diagnostic methods

Abstract

The topic of this thesis was the diagnostics of malaria in areas of low incidence using current and under-development nucleic acid detection tests. This review addressed general information about malaria, its prevalence, spread mechanism, prevention, clinical manifestations, symptoms, treatment, and traditional diagnostics. The review focused primarily on examining studies on the performance of current and under-development nucleic acid detection tests in identifying malaria and determining the degree of parasitemia in areas of low incidence. The review discussed the various diagnostic methods for malaria and their ability to identify the pathogen causing malaria. The literature used in this review was mainly articles found in PubMed, which discussed the performance of nucleic acid detection tests in malaria diagnosis in its areas of low incidence.

It was found that nucleic acid detection tests are more sensitive in identifying malaria compared to microscopy, and false negative results are rare. It was often noted that nucleic acid detection tests showed positive results during treatment when microscopy could no longer detect malaria parasites. The review showed that the tests were able to assess the degree of parasitemia with at least moderate reliability. An issue in some tests was the test's long performance time, and one test was unable to identify *P. knowlesi* infection. Furthermore, there was conflicting information about the performance of nucleic acid detection tests in identifying mixed malaria infections. Future studies are needed on the clinical significance of positive results in assessing treatment response.

Sisällysluettelo

1 Johdanto	5
2 Tausta	5
2.1 Malarian epidemiologia	6
2.2 Malarian tartuntatavat ja patogeneesi	6
2.3 Malarian ennaltaehkäisy	8
2.4 Malarian kliininen kuva	8
2.5 Malarian hoito	10
2.6 Malarian diagnostiikka	10
2. Perinteiset malarian diagnostiset menetelmät	12
2.8 Malarian parasitemia-asteen seuranta ja sen haasteet	15
3. Kirjallisuuskatsaus	15
3.1 Tavoitteet	15
3.2 Aineisto ja menetelmät	16
3.3 Nykyiset nukleiinihapon osoitusmenetelmät	16
3.3.1 LAMP-PCR	17
3.3.1.1 LAMP-PCR:n suorituskyky	17
3.3.1.2 LAMP-PCR:n käyttö diagnostiikassa	18
3.3.2 RT-PCR	19
3.3.2.1 RT-PCR:n suorituskyky	19
3.3.2.2 RT-PCR:n käyttö diagnostiikassa	20
3.4 Kehitteillä oleva nukleiinihapon osoitusmenetelmät	20
3.4.1 RealStar PCR	20
3.4.2 RealStar PCR:n suorituskyky	21
3.4.3 MC004-PCR	22
3.4.4 MC004-PCR:n suorituskyky	22
3.4.5 FRET-PCR	24
3.4.6 FRET-PCR:n suorituskyky	24
3.4.7 TaqMan In-house PCR	26
3.4.8 TaqMan In-House PCR:n suorituskyky	26
3.4.9 18S qPCR	27
3.4.10 18S qPCR:n suorituskyky	27
4. Pohdinta	28
Lähdeluettelo	29

1 Johdanto

Malaria on yksi maailmanlaajuisesti tärkeimpiä parasiitin aiheuttamia kuumetauteja ja sitä esiintyy pääsääntöisesti kotoperäisenä Afrikassa. Malaria on aiemmin tunnettu Euroopassa kotoperäisenä tautina 1800-luvulta lähtien, mutta sittemmin se on saatu hävitettyä kotoperäisenä lajina vuoden 1975 loppuun mennessä(1). Maailman terveysjärjestön (WHO, *World Health Organization*) mukaan malaria kuuluu maailman pahimpiin globaaleihin terveysongelmiin. Malariatapauksista 95 % diagnosoidaan Afrikassa ja myös kaikista kuolemista 96 % tapahtuu Afrikassa. Vuonna 2021 rekisteröitiin 247 miljoonaa malariatapausta, mikä oli edelliseen vuoteen verrattuna 2 miljoonaa enemmän. Vaikean tautimuodon kehittämisen riskiryhmään kuuluivat alle 5-vuotiaat lapset, raskaana olevat naiset, matkailijat ja HIV/AIDS-potilaat(2).

Malarian varhainen toteaminen ja hoito vähentää huomattavasti vaikeiden tautimuotojen kehittymisen riskiä sekä kuolleisuutta. Korkean ilmaantuvuuden alueilla keskeisessä osassa diagnostiikkaa ovat mikroskopiatutkimukset sekä nopeaan patogeenintunnistukseen tarkoitettut ns. rapid detection test -antigeenitestit (RDT-testit). Malarian diagnostiikassa keskeisessä osassa ovat myös nukleiinihapon osoitustestit (NhO-testit), jotka ovat herkkiä ja tarkkoja tunnistamaan malariaparasitteja. Vaikka NhO-testit ovat erinomaisia tunnistamaan malarian aiheuttavia parasiitteja malarian eri tautimuodoissa, kuten vaikeissa malariainfektioissa mutta myös alhaisen parasitemia-asteen infektioiden, ne eivät kuulu WHO:n suosituksiin ensisijaisena tutkimuksena. Syitä tähän ovat mm. NhO-testien huonempi kustannustehokkuus ja siitä koituvat korkeammat kustannukset, tulosten saamisen viive ja testien suorittamiseen tarvittava koulutus sekä erityislaitteet (3). Tässä kirjallisuuskatsauksessa keskitytään malarian diagnostiikkaan matalan ilmaantuvuuden alueilla perinteisin menetelmin ja nukleiinihappo-osoitukseen perustuvalla menetelmällä.

2 Tausta

Malaria on *Plasmodium*-alkueläimen aiheuttama vakava trooppinen kuumetauti, joka leviää pääsääntöisesti *Anopheles*-suvun naarashyönteiden piston välityksellä. Hyvin harvinaisia leviämisteitä ovat verensiirrot, kontaminoituneet neulat, elinsiirrot ja raskaana olevasta naisesta

lapseen siirtyminen (2). Ihmisillä malariaa aiheuttavia malarialoislajeja ovat *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax*, *P. knowlesi* ja *P. falciparum*. Näistä lajeista *P. falciparum* pidetään vakavimman taudinkuvan aiheuttajana, ja se aiheuttaa n. 90 % maailman malariatapauksista (4). Malarian itämisaika vaihtelee *Plasmodium*-lajin mukaan, mutta yleisesti sen itämisaikan ajatellaan olevan 7–14 vrk.

Korkean malariailmaantuvuuden alueelta palaavalta kuumeilevalta matkailijalta on poissuljettava malaria, vaikka käytössä olisi ollut asianmukainen estolääkitys (5). Malariaa epäiltäessä otetaan verinäytteitä, joista valmistetaan sively- ja paksupisaranäytteitä mikroskopointia varten. Diagnostisina apuvälineinä on käytössä myös NhO-testit, ja myös RDT-antigeenitestejä on käytetty mikroskopian tukena. Malarian toteamisen jälkeen hoito on aloitettava välittömästi. Hoitoon vaikuttavia tekijöitä ovat potilaan yleiskunto, malarialoisen laji ja ns. parasitemia-aste, eli kuinka suuri osa veren punasoluista on infektoitunut parasitiilla. Yleensä lääkehoidossa on käytössä artemisiini johdannaiset ja niitä sisältävät yhdistelmävalmisteet (5).

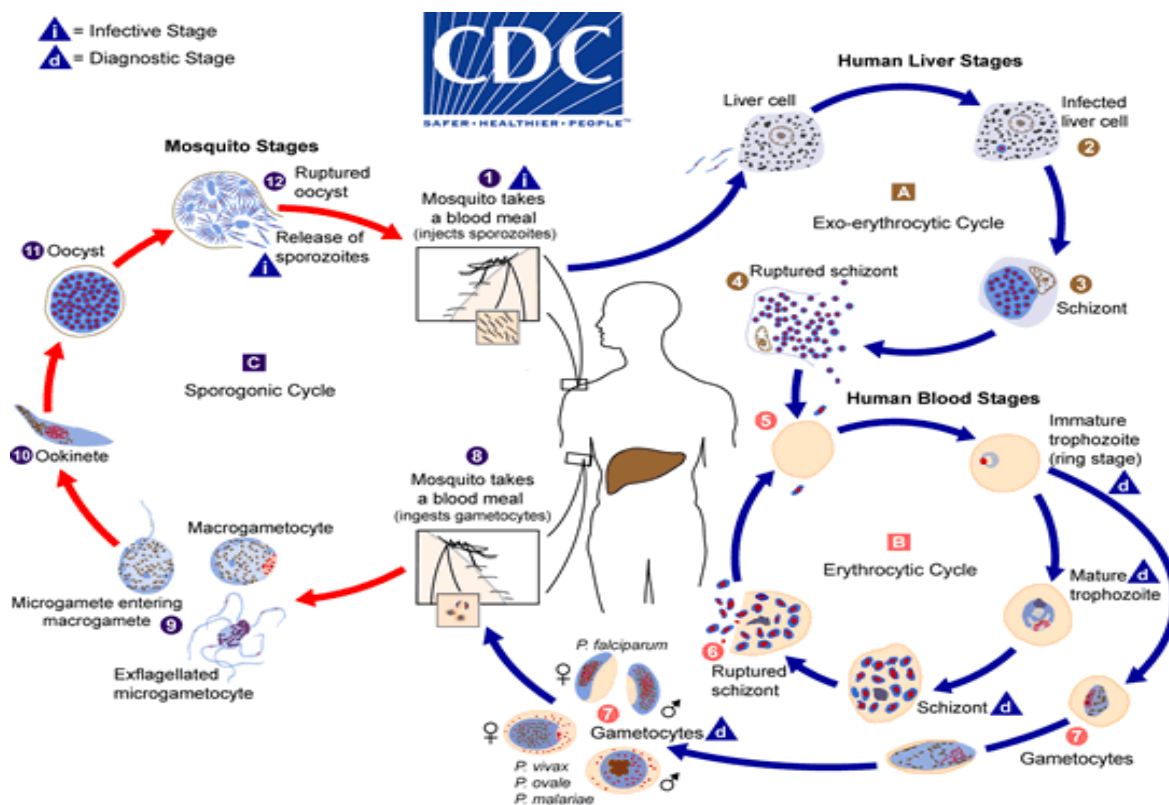
2.1 Malarian epidemiologia

Malariaa todetaan vuosittain n. 250 miljoonaa tapausta, joista 95 % todetaan sen kotoperäisillä alueilla (2). Malariaa esiintyy enimmäkseen Afrikassa, mutta sitä todetaan myös Länsi- ja Etelä-Aasiassa sekä Etelä- ja Keski-Amerikassa. Kuolemantapauksien määrä malariassa on vuosittain noin 620 000. Puolet malarian aiheuttamista kuolemantapauksista tapahtuu Afrikan neljässä maassa, joita ovat Nigeria, Kongon demokraattinen tasavalta, Tansania ja Niger (2). Euroopassa todettiin vuonna 2021 4 855 malariatapausta, joista 99,7 % liittyi matkustamiseen korkean ilmaantuvuuden alueelle. THL:n rekisterin mukaan Suomessa todettiin vuonna 2022 49 malariatapausta, joista 86 % oli *P. falciparum* aiheuttamia (6). Malaria on hoitamattomana korkean kuolleisuuden tauti ja hoidettunakin länsimaissa kuolleisuus on n. 1–4 % tasoa (7).

2.2 Malarian tartuntatavat ja patogeneesi

Malaria tarttuu pääsääntöisesti malariasääsken pistoksen välityksellä. Pistoksen aikana malariaparasiittejä siirtyy ihmisen verenkiertoon, josta ne siirtyvät muutamissa minuuteissa maksaan. Maksassa parasitiitit lisääntyvät suvuttomasti ja moninkertaistuvat. Lisääntyminen kestää yleensä n. 7–14 päivän ajan, mutta tietyt *Plasmodium*-lajit voivat muodostaa maksaan ns. hypnotsoiitteja, joiden avulla ne voivat piileksiä inaktiivisena muotona maksasoluissa kuukaudesta

vuosiin. Seuraavassa vaiheessa malariaparasitit siirtyvät maksasoluista verenkierron punasoluihin, joiden sisällä ne lisääntyvät ja tuhoavat punasolun. Tämän jälkeen ne etsivät verenkierrosta uuden punasolun toistaen saman syklin. Osa punasoluissa olevista parasiiteista kehittyi sukusoluiksi, jotka voivat jatkaa suvullista lisääntymistä päätyessään takaisin hyttyseen tämän imiessä verta malariaa sairastavalta ihmiseltä (5).



Lähde: CDC, kuvan tuottanut CDC. Kopiointivapaa materiaali. Saatavissa:

<https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>

Kuva 1. Malariaparasitiin kierto kulku malariasääsken ja ihmisen välillä.

P. falciparumia pidetään vaarallisimpana malarian aiheuttajana, sillä se kykenee lisääntymään kaikenikäisissä punasoluissa sen pintaproteiinin PfEMP1:n avulla. *P. falciparum* muokkaa myös infektoimiensa punasolujen pintaa niin, että punasolut tarttuvat herkemmin toisiinsa ja voivat aiheuttaa tukoksia. Lisääntyneen *P. falciparumin* seurauksesta punasolut hajoavat. Tämä stimuloi ihmisellä tulehdustilan syntymistä makrofagien ja sytokiinien lisääntymisen välityksellä (8).

P. malariae aiheuttaa lievimmän muodon malariasta, koska se ei voi aiheuttaa merkittävää parasitemia-astetta pystyessään lisääntymään vain vanhoissa punasoluissa. *P. vivax* ja *P. ovale* lisääntyvät pääasiassa kypsymättömissä punasoluissa eli retikulosyyteissä ja ne käyttävät Duffy-

antigeeniä siirtyäkseen punasoluihin. Edellä mainitut kolme malariaparasitiittiä eivät ole yhtä vaarallisia *P. falciparumiin* verrattuna, sillä niiden kyky lisätä tukosriskiä, aktivoida tulehdusreaktioita ja infektoida punasoluja on vähäisempi.

P. knowlesi muistuttaa *P. falciparumia* patogeneesin suhteen. Se on kaikista muodoista harvinaisin ja sitä esiintyy Kaakkois-Aasiassa. Se voi siirtyä ihmiseen apinasta ns. vektorivälitteisesti, kun *Anopheles*-hyttynen pistää tartunnan saanutta apinaa ja imee *P. knowlesi* -gametosyyttejä ja siirtää näitä myöhemmin ihmiseen (8).

2.3 Malarian ennaltaehkäisy

Hyvin toteutuva ennaltaehkäisy koostuu monesta komponentista. Estolääkitys vähentää merkittävästi riskiä *P. falciparumin* ja *P. malariaen* aiheuttamien tautien puhkeamiseen, mutta se ei estä *P. vivaxin* ja *P. ovalen* aiheuttamien hypnotsoittien muodostumista. Estolääkitys valikoituu yleensä kohdemaan, matkan pituuden ja lääkkeen sopivuuden perusteella. Käytössä olevia estolääkkeitä ovat mm. doksisykliini, meflokiini ja atovakonin ja proguaniilin yhdistelmä. Estolääkkeiden on todettu olevan keskenään yhtä tehokkaita. Kaikkia estolääkkeitä yhdistää se, että ne tulee aloittaa ennen korkean ilmaantuvuuden alueille siirtymistä ja jatkaa vielä tietyn ajan alueelta poistumisen jälkeen (3).

Malariaa voidaan ennaltaehkäistä myös pukeutumisella ja käyttämällä hyttysverkkoja, joidenläpi malariasääsket eivät pääse. Suojaavaan pukeutumiseen kuuluvat mm. pitkähihaiset paidat ja pitkälahkeiset housut. Pistokset tapahtuvat yleensä yöaikaan, joten permetriinillä käsitellyt vuodetta ympäröivät hyttysverkot ovat tehokkaita estämään pistoksia. Muita ennaltaehkäisykeinoja ovat iholle laitettavat DEET-hyönteiskarkotteet ja seiniin ja kattoihin ruiskutettavat karkotteet (9).

2.4 Malarian kliininen kuva

Malarian oireet ovat yleensä vaihtelevia ja epämääräisiä. Oireet muistuttavat usein tavallista gastroenteriittiä ja flunssaa. Klassisimpina oireina pidetään horkkamaista kuumetta, joka yleensä ilmenee voimakkaana kuumeena, jonka aikana potilaalla saattaa esiintyä päänsärkyä, lihaskipuja, pahoinvointia, oksentelua, ripulia ja usein myös voimakasta väsymystä (1). On tärkeää muistaa, että Suomeen palannutta malarian riskialueilla vastikään matkannutta kuumeilevaa potilasta pidetään malariaa sairastavana, kunnes toisin todetaan (5).

Kuume on luonteeltaan yleensä kolmivaiheinen, joista ensimmäisenä vaiheena nähdään ns. horkkavaihe. Tässä kuume nousee yleensä äkillisesti, ja sen aikana potilas on huonovointinen. Kuumetta voi olla jopa yli 40°C ja siihen voi liittyä vilunväristyksiä. Toinen vaihe on yleensä ns. kuumevaihe, jossa iholle voi tulla punoitusta ja kuivuutta ja potilaalla voi esiintyä sekavuutta. Kolmantena vaiheena on hikoiluvaihe, jolloin potilas hikoilee voimakkaasti, lämpö laskee normaaliin kehonlämpötilaan ja potilas saattaa kokea vointinsa normaaliksi jo muutaman tunnin kuluttua. Malarialle on tyypillistä, että näitä kuumejaksoja saattaa esiintyä n. 36–72 h välein (1).

Komplisoitunutta malariaa aiheuttavat pääasiassa vain *P. falciparum* ja *P. knowlesi*. Komplisoitumista edesauttavat näiden parasiittimuotojen kyky infektoida kaikkia punasoluja kypsyyssasteesta ja iästä riippumatta sekä punasolujen pinnalla tapahtuvat muutokset, jotka mahdollistavat verihyytymien muodostuksen (4). Komplisoituneen malarian oireita on esitetty taulukossa 1.

TAULUKKO 1. Vakavan komplisoituneen falciparum-malarian oireet aikuisilla ja lapsilla. Mukailtu taulukosta, joka on peräisin Heli Siikamäen ja Hannu Kyrönsepän artikkelista Malaria (1).

Kliininen oire	1 Esiintyvyys		2 Liittyy huonoon ennusteeseen	
	Lapset	Aikuiset	Lapset	Aikuiset
Huonontunut yleistila	+++	+++	+	?
Tajunnan heikkeneminen	+++	++	+++	+
Toistuva kouristelu	+++	+	+	++
Verenkiertokollapsi	+	+	+++	+++
Hengitysvaikeudet	+++	+	+++	+++
Keuhkopöhö röntgenkuvassa	+/-	+	+++	+++
Keltaisuus	+	+++	++	+

1: +/- = harvinainen, + = suhteellisen yleinen, ++ = yleinen, +++ = erittäin yleinen
2: + = jonkin verran, ++ = kohtalaisesti, +++ = vahvasti, ? = ei tiedetä

Komplisoituneessa malariassa laboratoriolöydöksinä voi olla alentunut verihiutaleiden eli trombosyyttien määrä, alentunut verensokeri, metabolinen asidoosi ja laktaattihydrogenaasin

määrän kasvaminen, maksa-arvojen kuten alaniiniaminotransferaasin ja aspartaattiaminotransferaasin kohoaminen, anemia, fibriinin D-dimeeri -arvon kohoaminen ja C-reaktiivisen proteiini -arvon kohoaminen (4).

2.5 Malarian hoito

Malarian hoito perustuu Suomessa artesimiinipohjaisiin yhdistelmähoitoihin, jotka ovat ensisijainen hoito useimmissa tapauksissa. Hoito ja lääkevalinta riippuvat *Plasmodium*-lajista sekä potilaan yleiskunnosta, oireista ja parasitemia-asteesta. Suomessa parasitemia-aste ei välttämättä aina ole määritettävissä päivystyksellisesti, jos paikallisesti ei tehdä sivelynäytteiden mikroskopiaa ja referenssilaboratorio on kaukana. NhO-testin ollessa positiivinen usein aloitetaan suonensisäinen (i.v., *intra venous*) artesunaatti taudin vaikeudesta riippumatta, jos mikroskopi tulosta ei saada päivystyksellisesti (10).

Yleisenä ohjeena on kuitenkin se, että potilaan ollessa huonokuntoinen tai parasitemia-asteen ollessa yli 2 % *P. falciparum* ja *P. knowlesin* aiheuttamissa infektioiden aloitetaan hoito i.v. artesunaatilla painonmukaisin annostuksin. Voinnin kohentuessa ja parasitemia-asteen vähentyessä voidaan siirtyä artesunaatin suun kautta annosteltavaan (p.o., *per os*) muotoon. Hyväkuntoisella potilaalla *P. falciparum* ja *P. knowlesin* aiheuttamassa taudissa voidaan aloittaa hoito artemeetterin ja lumefantriinin tai atorvakonin ja proguanilin yhdistelmällä. Muissa malarian muodoissa hoito tapahtuu yleensä p.o. klorokiinilla tai p.o. klorokiiniin ja primakiiniin yhdistelmällä. Malarian hyvään hoitoon kuuluvat myös oireiden hoito eli potilaskohtaisesti mahdollinen kipulääkitys ja nesteytys. Lääkehoidon kesto on yleensä viidestä seitsemään päivään, mutta se vaihtelee tapauskohtaisesti lääkehoidon vasteen mukaan (10).

2.6 Malarian diagnostiikka

Varhainen onnistunut diagnostiikka vähentää merkittävästi malarian komplisoitumista. Diagnostiikan kulmakivenä ja ns. kultaisena standardina on jo pitkään toiminut ns. perifeerisen veren mikroskopi tutkimus. Tämän lisäksi joissakin paikoissa on mikroskopian ohella käytetty myös antigeenitestejä.

2000-luvun alussa Suomessa malarian diagnostiikkaan otettiin käyttöön NhO-testi, joka mahdollisti malarian herkemmän diagnostiikan. Tämä oli HUSLABin kehittämä

polymeraasiketjureaktioon (PCR, *polymerase chain reaction*) perustuva testi, joka pyrki tunnistamaan verinäytteestä *Plasmodium*-lajien deoksiribonukleiinihappoa (DNA) (11). Tällä vuosituhannella NhO-testit ovat alkaneet yleistymään, sillä ne ovat tehokkaita havaitsemaan parasiitteja myös tilanteissa, joissa parasitemia-aste on matala (11). NhO-testit voivat myös olla mikroskopiaa herkempiä ja tarkempia havaitsemaan eri *Plasmodium*-lajeja. Kääntöpuolena nykyisin käytössä olevat NhO-testit saattavat viedä mikroskopiaa enemmän aikaa ja vaativat asianmukaiset laitteet. Suomessa käytössä olevalla Meridian Biosciencen valmistamalla Alethia Malaria -testillä pystytään löytämään kaikki viisi *Plasmodium*-lajia, mutta parasitemia-asteen määrittäminen tai lajimääritys ei ole mahdollista(10).

Malarian matalan ilmaantuvuuden alueilla NhO-testien suorittamisen vähäisyys voi vaikuttaa tulosten laatuun ja tarkkuuteen. Nukleiinihapon osoitukseen pohjautuvan diagnostiikan käyttö on kallista ja resurssit tämän käyttöön voivat olla rajallisia, esim. maasta riippuen. Joskus kääntöpuolena NhO-testit voivat olla liiankin herkkiä tunnistamaan DNA:ta kuolleista parasiiteista. Tämä voi antaa valheellisen väärän positiivisen tuloksen parasitemia-asteen seurannassa, mutta toisaalta hyvä herkkyys tunnistamisessa voi nopeuttaa malarian diagnosointia ja latentin infektion tunnistamista (11).

Tällä hetkellä suurin osa Suomen yliopistollisten sairaaloiden laboratorioista käyttää malariainfektion päivystysluonteisessa diagnostiikassa jotakin NhO-testiä. Päivystyksellisesti toteutettavan alustavan mikroskopian toteuttaminen vaihtelee paikoittain, eikä sitä ole kaikkialla saatavissa. On myös laboratorioita, jotka eivät käytä NhO-menetelmää malarian päivystyksellisessä diagnostiikassa, vaan tukeutuvat mikroskopiaan sekä mahdollisesti RDT-pikatestiin. Riippumatta päivystyksellisesti käytetyistä laboratoriomenetelmistä, useat laboratoriot lähettävät sively- ja paksupisaravalmisteita referenssilaboratorioon HUS:n parasitologian yksikköön, jossa arkipäivinä tapahtuu näytteiden varmistustutkimukset, parasitemia-asteen tarkka arvio ja taudinaiheuttajan lajimääritys. Eroavaisuudet malarian diagnostisissa menetelmissä voivat kuitenkin jossain määrin asettaa ihmiset eriarvoiseen asemaan malarian diagnostiikassa, esim. onko tieto parasitemia-asteesta saatavissa päivystyksellisesti vai ei, mikä voi vaikuttaa potilaan hoidon toteuttamiseen.

ISLABin tämänhetkisessä toimintamallissa malariainfektiota epäiltäessä potilaalta otetaan 3 ml EDTA-kokoverta, joka tutkitaan Alethia Malaria NhO-menetelmällä. Ensimmäinen EDTA-kokoveresta tehty NhO-testi vastataan päivystyksellisesti, mutta mahdolliset myöhempien

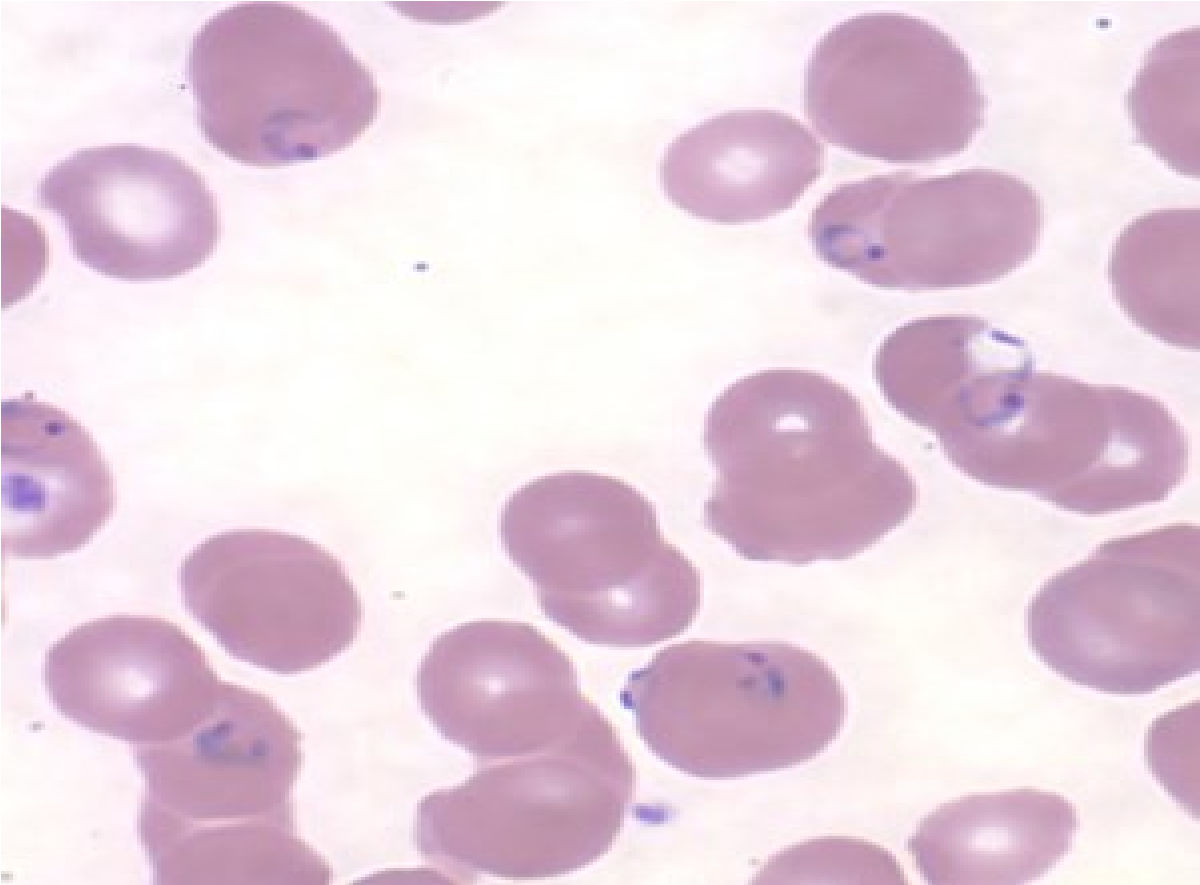
näytteiden B- PlasNhO - tutkimukset tehdään ja vastataan ei-päivystyksellisesti päiväsaikaan. Lisäksi potilaalta otetaan ihopistosnäyte, josta valmistetaan 4 sivelynäytettä ja 4 paksupisaranäytettä. Mikäli ensimmäinen NhO-testi osoittautuu positiiviseksi, alustava parasitemia-aste arvioidaan ISLAB:ssa päivittäin klo 9–15. Kaikista ISLAB:n potilaista lähetetään sively- ja paksupisaravalmisteet HUS:n parasitologian yksikköön arvioitavaksi huolimatta NhO-testin tuloksesta (15), koska ISLAB laboratorikeskuksen kokemus NhO-testien käytöstä on kuitenkin vasta alussa ja malariaepäilymäärät ovat viime vuosina olleet varsin vähäisiä.

2.7 Perinteiset malarian diagnosointi menetelmät

Mikroskopiolla suoritettava diagnostiikka on malarian diagnostiikan kultainen standardi. Sen avulla pystytään selvittämään parasiittilajin lisäksi myös parasitemia-aste eli parasiiteilla infektoiduneiden punasolujen osuus verrattuna kaikkiin punasoluihin. Parasitemia-aste jaetaan neljään kategoriaan, joita ovat 0 %, alle 2 %, 2–5 % ja yli 5 %. Mikroskopia on hyvin herkkä ja tarkka menetelmä malarian diagnosointiin, mutta se voi olla NhO-testejä vähemmän herkkä *Plasmodium*-parasiittien löytämisessä parasitemia-asteen ollessa hyvin pieni tai infektion ollessa alkuvaiheessa (10).

Mikroskopiaturkimuksia varten malariaa epäiltäessä otetaan sormenpästä sively- ja paksupisaranäytteitä 3–4 kpl, joista perinteisesti vähintään yksi sivelynäyte tutkitaan päivystyksellisesti. Seuraavat näytteet otetaan 4–6 h aikana diagnoosiepäilyn heräämisestä mieluiten kuumepiikkien aikana, jolloin parasitemia-asteen arviointi on luotettavampaa (12).

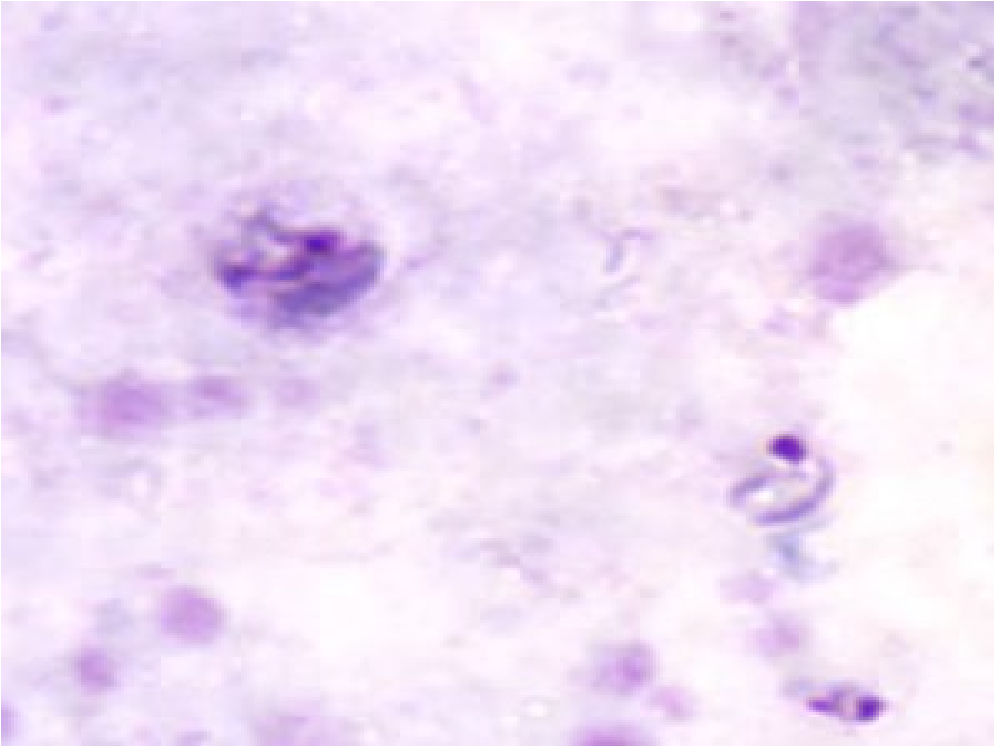
Sivelyvalmiste värjätään 10 %:lla giemsaliuoksella tai May-Grunwald-Giemsan värjäyksellä. Vähintään yksi sivelynäyte on perinteisesti tutkittu päivystyksellisesti laboratoriossa. Näytteistä pyritään etsimään malariaplasmodeja punasoluista tuhatkertaisella suurennuksella. Punasoluista pyritään löytämään plasmodirenkaita. Paksupisaranäytteestä malarian osoittaminen on huomattavasti herkempää, mutta sen tulkinta vaatii enemmän kokemusta verrattuna sivelynäytteeseen, joten se tutkitaan yleensä referenssilaboratoriossa. Suomessa jokaisesta epäilystä malariatapauksesta tulee lähettää ko. sively- ja paksupisaranäytteet referenssilaboratorioon (pääasiassa HUS parasitologian yksikkö) (5, 10).



Lähde: Kuva otettu CDC:n kuvapankista. <https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html#tabs-1-2>

Kuva 2. Sivelyvalmiste verinäytteestä, jossa on havaittavissa *P. falciparum* rengasmuotoja.

Paksupisaranäytteessä verinäytteen punasolukerrosia hajotetaan osmoottisesti vedellä, jonka avulla parasiitit pystytään havaitsemaan paremmin mikroskoopilla.



Lähde: Kuva otettu CDC:n kuvapankista. <https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html#tabs-1-2>

Kuva 3. Paksupisaravalmiste verinäytteestä, jossa on havaittavissa *P. malariae* muodostamia trofotsoitteja.

Mikroskopian haasteena on, että se vaatii runsaasti kliinistä kokemusta mikroskopioijalta. Kliinisen kokemuksen kerryttäminen vaatii toistoa negatiivisten ja positiivisten malarianäytteiden tulkinnasta. Matalan ilmaantuvuuden alueilla tämä on haasteellista vähäisien näytemäärien takia (11).

Aiemmin Suomessa oli monessa yliopistollisissa sairaaloissa päivystysdiagnostiikassa mikroskopian lisäksi käytössä malariapikatestejä, jotka perustuvat malarian tuottaman proteiinin tunnistamiseen verestä antigeeniosoituksen avulla. Pikatesti on nopea diagnostinen testi *Plasmodium*-loisen havaitsemiseksi, mutta se ei kykene tunnistamaan parasitemia-astetta ja se saattaa antaa vääriä positiivisia tuloksia ristireagoinnin takia. Antigeenitestien on todettu olevan huonoja tunnistamaan latentteja ja alhaisen parasitemia-asteen infektoita. Antigeenitesti-osoitukseen perustuvista pikatesteistä kuitenkin luovuttiin useissa yliopistollisissa sairaaloissa huonon herkkyuden vuoksi ja NhO-testien ollessa tarkempia ja herkempiä aiempiin pikatesteihin verrattuna sekä mahdollisesti kustannustehokkaampia. (11,13). Antigeenitesti on kuitenkin edelleen käytössä Suomessa päivystysdiagnostiikassa joissakin laboratorioissa (14).

2.8 Malarian parasitemia-asteen seuranta ja sen haasteet

Parasitemia-asteen määrittäminen on tärkeässä roolissa arvioitaessa annetun hoidon vastetta ja kuvattaessa taudin vakavuutta. Etenkin *P. falciparumin* hoidossa se on erityisen tärkeää, sillä korkean parasitemia-asteen tiedetään aiheuttavan vakavia komplikaatioita, jotka ovat harvinaisia muissa malarian muodoilla. Tavallisesti parasitemia-asteen seurantatiheys määräytyy potilaan yleiskunnon mukaan. Tyypillisesti seuranta toteutetaan malarian vaikeusasteesta riippuen joko useita kertoja päivässä tai lievemmissä tapauksissa harvemmin, esim. vuorokauden välein. Tällä hetkellä Suomessa monissa laboratorioissa käytössä olevalla NhO-testillä ei pystytä seuraamaan parasitemia-astetta eikä näin ollen infektion vaikeusastetta ja lääkähoidon vastetta. Tämän vuoksi parasitemia-asteen seurantaan käytetään yleensä mikroskopiamenetelmiä.

Tulevaisuuden haasteena on kehittää NhO-testi, joka on riittävän tarkka ja herkkä tunnistamaan malarian ja joka kykenee myös lajimääritykseen ja parasitemia-asteen määrittämiseen. Tämänkaltaisen NhO-testin olisi hyvä, sillä sen avulla mikroskooppisen osaamisen tarve vähenisi ja potilaat olisivat tasa-arvoisemmassa asemassa riippumatta asuinpaikkansa etäisyydestä referenssilaboratorioon. Lisäksi vähäoireisemmat matalan parasitemia-asteen malariainfektiot voisivat olla helpommin tunnistettavissa.

3. Kirjallisuuskatsaus

3.1 Tavoitteet

Katsauksen tavoitteena on etsiä kirjallisuudesta ja julkaisuista tietoa nykyisistä ja uusista kehitteillä olevista NhO-testeistä ja erityisesti niiden herkkyydestä ja tarkkuudesta malariaplasmoidien tunnistamisessa sekä kyvystä seurata infektion parasitemia-astetta kliinisissä potilasnäytteissä. Tavoitteena on selvittää, onko markkinoille tullut tai tulossa NhO-testejä, jotka ovat herkkiä tunnistamaan malariainfektion ja kykenevät tarkkaan lajimääritykseen sekä parasitemia-asteen seurantaan hoidon toteutuksen aikana. Yksi päätavoitteista on selvittää uusien tai kehitteillä olevien NhO-testien suorituskyky verrattuna mikroskopiaan.

3.2 Aineisto ja menetelmät

Katsaus rajattiin niin, että siihen käytettävä aineisto koostuu pääasiallisesti malarian diagnostiikasta NhO-testeillä sen matalan ilmaantuvuuden alueilla. Katsaukseen etsitty aineisto rajattiin vuodesta 2016 eteenpäin, sillä katsauksen aiheena ovat käytössä ja kehitteillä olevat NhO-testit. Aineistoa etsittiin pääasiallisesti PubMed tietokannasta (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>). Hakutermeinä käytettiin mm. "Malaria"AND"parasite-density", "parasitemia", "diagnostic test", "nucleid acid", "PCR" AND "non-endemic" ja "screening". Artikkeleiden aiheina olivat mm. diagnostiikan haastavuus matalan ilmaantuvuuden alueilla ja erilaisten diagnostisten työkalujen vertailu, kuten silmukkavälitteiseen isotermaaliseen DNA:n monistukseen perustuvan PCR:n (LAMP, *loop-mediated isothermal DNA amplification*) ja reaaliaikaisen PCR:n (Real-time PCR, RT-PCR) suorituskyvyn vertailu matalan ilmaantuvuuden alueilla. Lisäksi tietoa etsittiin suomenkielisistä lähteistä mm. Duodecimin Mikrobiologian ja Infektiotautien kirjoista, THL:n internetsivuilta, Terveystieteen artikkelista ja Duodecimin artikkeleista (1,4–6,10–12). Tietoa etsittiin myös englanninkielisestä kirjallisuudesta WHO:n sivuilta, ECDC:stä ja CDC:stä (2,3,9,16).

3.3 Nykyiset nukleiinihapon osoitusmenetelmät

Nukleiinihappo-osoitukseen pohjautuvat testit tulivat ensi kerran markkinoille malarian diagnostiikkaan maailmalla 1990-luvun lopussa, ja malarian diagnostisena välineenä ne ovat yleistyneet viime vuosikymmenen aikana (11).

Nukleiinihapon-osoitukseen perustuvissa testeissä peruseriaatteena on pyrkiä löytämään etsityn parasiitin DNA:ta sen eksponentiaalisen monistuksen avulla. Perinteisessä PCR:ssä prosessi alkaa niin, että potilaalta otetaan pieni määrä verta, n. 3 ml, josta pyritään eristämään etsittyä DNA:ta. Eristettyä DNA:ta monistetaan reagenssisarjan kahdella alukkeella ja DNA-polymeraasilla eksponentiaalisesti syklisesti vaihtuvassa lämpötilassa (tyypillisesti välillä 50–98 °C). Kahdella alukkeella pyritään rajaamaan tietty pätkä kohde-DNA:ta, jota halutaan monistaa. Monistusvaihe kestää yleensä 1–3 h ajan, jonka jälkeen laitteistosta analysoidaan, löytyykö etsittyä DNA:ta (11).

Nykyisin monissa Suomen sairaaloissa on käytäntönä tehdä NhO-testi päivystyksellisesti potilailta, joilla epäillään malariaa. NhO-testi tehdään 3 ml EDTA-näytteestä (10,12).

Malarian NhO-diagnostiikassa on käytössä tällä hetkellä pääasiallisesti kahden tyyppisiä NhO-testejä, joista ensimmäinen on silmukavälitteiseen isotermaaliseen DNA monistukseen (LAMP, loop-mediated isothermal DNA amplification) perustuva PCR-testi. LAMP-PCR on helppokäyttöisempi ja tehokkaampi aiempiin PCR-testeihin vertailtuna (17). Toinen yleisimmin käytetty NhO-testi on RT-PCR, joka perustuu spesifisen DNA-alueen monistamiseen ja sen havaitsemiseen merkkiaineen avulla (18).

Vuosien saatossa on tehty tutkimuksia, joissa NhO-testien on todettu olevan mikroskopiaa herkempiä tunnistamaan *Plasmodium*-infektioita, etenkin kun kyseessä on matala parasitemia-aste tai sekainfektio (19). NhO-testit ovat hyvä työkalu mikroskopian ohelle, sillä niiden avulla voidaan diagnosoida infektioita, joita mikroskopiolla ei ole mahdollista diagnosoida. NhO-testien avulla pystytään vähentämään vääristä negatiivisista diagnooseista koituvaa taloudellista taakkaa mahdollistamalla ajoissa tapahtuva hoidon aloitus. Kääntöpuolena PCR:ään perustuvat testit ovat kalliimpia ja usein enemmän aikaa vieviä perinteiseen mikroskopiaan verrattuna (20).

3.3.1 LAMP-PCR

LAMP-PCR:n erona perinteisiin PCR-testeihin on se, että se toimii vakioidussa lämpötilassa, alukkeita on yleensä 4–6 kpl ja laitteisto on yksinkertaisempi. LAMP on yleensä perinteiseen PCR:ään verrattuna nopeampi menetelmä, sillä se ei vaadi syklistä lämpötilan muutosta ja alukkeita on enemmän, joten kohde-DNA:sta pystytään tunnistamaan useita eri sekvenssejä ja tämä taas nopeuttaa DNA:n monistusta. LAMP-testin etuna on, että monistettavia kohteita on useampia, mikä nostaa tutkimusmenetelmän herkkyyttä ja tarkkuutta aiempiin menetelmiin verrattuna (21). Suomessa on tällä hetkellä käytössä Alethia Malaria -NhO-testi, joka perustuu LAMP-menetelmään (10).

3.3.1.1 LAMP-PCR suorituskyky

LAMP-PCR on alkanut yleistyä viimeisen kymmenen vuoden aikana. Sen etuna on helppokäyttöisyys, vähäinen koulutustarve ja nopea n. 1 h 30 min suoritus aika. LAMP-PCR on osoittanut herkäksi ja tarkaksi malarian tunnistamisessa ja se kykenee osoittamaan kaikkien malarialajien aiheuttamat infektiot. Rajoituksena on testin kallis hinta ja se, että se ei kykene tarkkaan lajimääritykseen eikä parasitemia-asteen arviointiin (22).

Espanjassa toteutettiin tutkimus, jossa vertailtiin Alethia-Malaria -Nho-testin suorituskykyä referenssi-PCR-testin suorituskykyyn. Aineistoksi valikoitu 114 malarian kotoperäisiltä alueilta palannutta matkailijaa, joista 85 sairasti malariaa. Alethia LAMP-testi pärjasi hyvin verraten referenssimenetelmään, jolla meni tulosten käsittelyyn 6 tuntia Alethian testin ollessa selvästi nopeampi. Testin herkkyys oli 98.84 %, tarkkuus 94.74 % ja kappakerroin 0.94. Tutkimuksessa testin alhaisimmaksi havaitsemisrajaksi malariainfektioille määritettiin 0,075 parasiittia/μl. Väärät tulokset tulivat yhdestä havaitsemattomasta *P. malariae* -infektiosta ja yhdestä näytteestä, jonka Alethia-testi tulkitse virheellisesti positiiviseksi. Syynä väärään positiiviseen tulokseen arveltiin olevan näytteen kontaminaatio (22).

LAMP-PCR:n hyvää suorituskykyä tukee myös Yhdysvalloissa suoritettu retrospektiivinen tutkimus, jossa Alethia-testin suorituskykyä vertailtiin PET-PCR (photo-induced electron transfer-PCR) menetelmään. Näytteitä tutkimuksessa oli 95 kappaletta, joista 90 oli positiivisia malariainfektion suhteen. Alethia-testi tunnisti 66 *P. falciparum*, viisi *P. vivax*, kahdeksan *P. ovale* ja kuusi *P. malariae* -infektiota sekä 3 sekainfektiota ja kaksi *P. knowlesi* -infektiota. Alethia-testin herkkyys oli 100 % ja tarkkuus 100 % kappakertoimen ollessa 1 (23).

Myös ranskalaisessa 2017 julkaistussa tutkimuksessa saatiin lupaavia tuloksia LAMP-PCR pohjaisen illumigene Malaria -testin (Alethia Malaria -testin aikaisempi nimi) hyvästä suorituskyvystä. Tutkimus toteutettiin yhden vuoden ajanjaksolla Ranskassa ja referenssimenetelmänä malarian diagnosointiin käytettiin sively- ja -paksupisaravalmisteiden mikroskopiaa. Näytteitä tutkimuksessa kerättiin 310 kappaletta ja ne arviotiin reaaliaikaisella PCR:llä sekä mikroskopoinnilla. Mikroskopia totesi 83 positiivista näytettä, kun taas LAMP totesi 93 näytettä positiiviseksi. Neljä näistä positiivisista näytteistä oli väärinä positiivisia tuloksia. Herkkyys illumigene-testillä oli 100 %, tarkkuus mikroskopiaan verraten 94.64 % ja negatiivinen ennustearvo 100 %. Illumigene-testiltä jäi tunnistamatta yksi *P. vivax* infektio. Testitulokset saatiin alle tunnissa ja hinta-arvioksi tuli n. 25 dollaria per testi (24).

3.3.1.2 LAMP-PCR:n käyttö diagnostiikassa

LAMP-PCR on hyvä työväline malarian diagnostiikkaan sen hyvän suorituskyvyn ja helppokäyttöisyyden vuoksi. Se voisi soveltua ensilinjan tutkimukseksi, kun halutaan tietää, onko potilaalla malariainfektio. Se vaatii kuitenkin aina mikroskopiolla toteutettavan diagnostiikan

tuekseen, sillä LAMP PCR:llä ei pystytä lajimääritykseen eikä parasitemia-asteen arvioon. Lisäksi tutkimuksissa osoitettiin LAMP-PCR:n ongelmaksi väärät positiiviset tulokset negatiivisissa kontrollinäytteissä sekä kontaminoitumisesta aiheutuvat väärät positiiviset testitulokset (25).

3.3.2 RT-PCR

RT-PCR perustuu spesifisen DNA-alueen monistamiseen ja samanaikaisesti tapahtuvaan monistuneen DNA:n havaitsemiseen fluoresoivan tai vihreän merkkiaineen avulla. Havaitseminen tapahtuu, kun fluoresoivaa tai vihreää merkkiainetta kiinnittyy DNA-juosteisiin samanaikaisesti monistuksen tapahtuessa. Merkkiaine havaitaan PCR-laitteessa fluoresenssina, jonka avulla testi pystyy määrittämään ilmentyneen DNA:n määrän ja tunnistamaan kohde-DNA:n. Yleisesti RT-PCR:ssä on käytetty SYBR green tai TaqMan -koettimia (18).

RT-PCR voidaan jakaa vielä erikseen ns. monoplex- ja multiplex-RT-PCR:ään. Monoplex-PCR:n avulla pystytään tunnistamaan vain yksi *Plasmodium*-laji, kun taas multiplex-PCR:llä pystytään tunnistamaan samanaikaisesti useampia *Plasmodium*-lajeja. Monoplex-PCR:n etuna on sen helppokäyttöisyys ja nopeus verrattuna multiplex-PCR:ään, parempi tarkkuus tunnistamisessa ja edullisempi hinta. RT-PCR:n avulla pystytään arvioimaan parasitemia-astetta suhteuttamalla monistuneen DNA:n määrä kalibroituihin arvoihin (26).

3.3.2.1 RT-PCR suorituskyky

RT-PCR:n suorituskykyyn ja tuloksiin vaikuttavat monet tekijät, kuten näytteiden käsittely, reagenssien laatu, kohdealueen valinta oligonukleotideilla ja olosuhteet, kuten lämpötila. Yleisesti reaaliaikaisen PCR:n suorituskykyä on pidetty hyvänä, johtuen sen kyvystä tunnistaa malariainfektio hyvällä herkkyydellä tarjoten samanaikaisesti lajimäärityksen. Viime vuosien aikana on julkaistu runsaasti tutkimuksia RT-PCR-menetelmän mahdollisuuksista parasitemia-asteen määrittämisessä.

Ranskalaisessa v. 2008 julkaistussa vertailututkimuksessa analysoitiin 15 tutkimuksesta saatuja tuloksia, joissa verrattiin RT-PCR:n suorituskykyä mikroskopiaan. Vertailututkimuksien perusteella 1108 potilasta todettiin positiiviseksi malariainfektion suhteen mikroskopiolla ja 1204 RT-PCR:llä. Kaikki mikroskopiolla positiiviset potilaat olivat myös RT-PCR:llä positiivisia, ja tämän herkkyuden katsottiin olevan 4.4 % parempi mikroskopiaan verrattuna (27).

Lisäksi hollantilaisessa Leidenin yliopistollisessa sairaalassa tehdyssä tutkimuksessa vertailtiin yhdeksän vuoden aikana kerättyjä malarianäytteitä RT-PCR:n herkkyudessa perinteiseen mikroskopiaan verrattuna. Näytteitä kerättiin 839 kappaletta 825 potilaalta. Näistä RT-PCR havaitsi 56 positiivista näytettä. Tutkimuksen aikana ei havaittu *P. knowlesi* tai sekainfektiota. Mikroskopiolla ei kyetty havaitsemaan yhtä *P. malariaen* aiheuttamaa infektiota, joka olisi jäänyt huomaamatta, jos käytössä ei olisi ollut RT-PCR-menetelmää. RT-PCR:n todettiin olevan herkempi ja tarkempi mikroskopiaan verrattuna. Lisäksi kolmea *P. falciparum* infektiota seurattiin hoidon aikana mikroskopiolla ja RT-PCR:llä 5–12 näytteen verran. Mikroskopiassa näytteet muuntuivat negatiiviseksi 4–8 päivän sisällä hoidon aloituksen jälkeen. Näissä kaikissa kolmessa infektiossa mikroskopia näytti negatiivista tulosta ennen PCR-menetelmää. Käytössä olleen RT-PCR:n CQ-arvot olivat verrannollisia mikroskopian tuloksiin parasiittitiheyden arvioinnissa (28).

3.3.2.2 RT-PCR:n käyttö diagnostiikassa

RT-PCR on ollut jo vuosituhannen vaihteesta lähtien käytössä diagnostiikan kulmakivenä mikroskopian tukena. Sen on todettu olevan erittäin herkkä ja tarkka, mutta ei kuitenkaan täysin ongelmaton. Yksi tärkeimmistä syistä, minkä takia RT-PCR ei ole vakiinnuttanut paikkaa ensisijaisena tutkimuksena mikroskopian sijasta, on sen pitkä analysointi aika, joka menee tulosten valmistumiseen (28). Lisäksi RT-PCR vaatii monimutkaisempia laboratoriolaitteita ja enemmän henkilökuntakoulutusta sekä se on hinta-arviolta kalliimpi perinteisempään mikroskopiaan verrattuna (29).

3.4 Kehitteillä olevat nukleiinihapon osoitusmenetelmät

3.4.1 RealStar PCR

RealStar PCR on altona Diagnostics -yhtiön kehittämä reaaliaikainen multiplex-PCR, joka kykenee malarian tunnistamisen lisäksi lajimääritykseen ja parasitemia-asteen arviointiin. Se on kehitetty Saksassa ja sen tavoite on helpottaa malarian diagnostiikkaa matalan ilmaantuvuuden alueilla, joilla mikroskopiakokemuksen kerryttäminen on haastavaa. Se ei kykene tunnistamaan *P. knowlesi* -infektiota, mikä rajoittaa sen käytön kannattavuutta Aasiassa, sillä kyseistä *Plasmodium*-lajia esiintyy pääasiallisesti vain Kaakkois-Aasiassa [29].

3.4.2 RealStar PCR:n suorituskyky

Saksassa tehtiin v. 2019 julkaisu, jossa verrattiin Hampurissa kehitetyn RealStar Screen&Type -PCR-testin suorituskykyä mikroskopiaan. Tutkimus toteutettiin Saksassa, ja tutkimusnäytteet oli otettu trooppisilta alueilta palanneilta matkailijoita. 817 potilaalta kerättiin yhteensä 1022 EDTA-verinäytettä, joista 247 näytteen (24,2 %) todettiin olevan positiivisia *Plasmodium*-DNA:n suhteen. 179 (72,5 %) näistä näytteistä testattiin positiivisiksi sekä mikroskopian että lajikohtaisen PCR:n avulla. Näytteistä 68 kpl (27,5 %) oli positiivisia vain lajikohtaisella PCR:llä. Tähän ajateltiin syyksi parasitemia-asteen tippuminen niin matalaksi, että infektioita ei kyetty enää havaitsemaan mikroskopiolla (30).

RealStar PCR-testin herkkyys mikroskopiassa positiivisiin näytteisiin verrattuna oli 98,9 %. RealStar onnistui tunnistamaan sekainfektiot, joita todettiin tutkimuksen aikana kolme kappaletta. Mikroskopia identifioi virheellisesti yhden *P. vivax* infektion *P. ovale* infektioksi, mikä varmistettiin toisella PCR-menetelmällä. Lisäksi tutkimuksessa oli kaksi potilasta, joilla diagnosoitiin mikroskopiolla *P. falciparum*-monoinfektio, mutta nämä tunnistettiin myöhemmin RealStar PCR:llä *P. falciparumin* ja *P. vivaxin* sekainfektioiksi (30).

Tutkimuksessa tarkasteltiin myös RealStar PCR:n kykyä seurata parasitemia-astetta. Ct-arvot, jotka kuvastavat parasitemia-astetta, olivat tämän tutkimuksen mukaan mikroskooppiseen parasiittitiheyteen verrattuna matalan ja kohtalaisen luotettavia. R^2 vaihteli välillä 0,20 ja 0,26, mikä osoittaa sen, että RealStar PCR ei ole erityisen hyvä parasitemia-asteen seurannassa verrattuna mikroskopiaan (30).

Lisäksi Espanjassa tehtiin retrospektiivinen tutkimus, joka toteutettiin Malaria and Emerging Parasitic Diseases -laboratoriosta saaduilla referenssinäytteillä. Näytteet otettiin malarian kotoperäisiltä alueilta palanneilta matkailijoilta ja maahanmuuttajilta ja ne tutkittiin Espanjan malarian referenssilaboratoriossa. Tutkimuksessa verrattiin RealStar Malaria Screen&Type -PCR:n suorituskykyä malarian tunnistamisessa, havaitsemisrajassa ja lajinmäärityksessä. Tutkimuksessa analysointiin yhteensä 121 näytettä. Jokaisesta *Plasmodium*-lajista oli 15 näytettä ja sekainfektiota sisältäviä näytteitä oli 16 näytettä. Lisäksi näytteiden joukossa oli 15 näytettä, jotka olivat *Plasmodium*-lajien suhteen negatiivisia, mutta sisälsi muita parasiittilajeja. Tutkimuksessa ei havaittu ristireaktioita muiden parasiitti-infektioiden kanssa. NHO-testi antoi negatiivisen tuloksen yhdelle *P. ovale* -infektioille ja tunnisti väärin kaksi sekainfektiota, joista ensimmäisen

kolmoisinfektioksi ja toisessa infektiossa *P. falciparum* + *P. malariae* -infektion yksittäisenä *P. malariae* infektiona. Täten retrospektiivisessä tutkimuksessa RealStar-testin herkkyydeksi saatiin 97,5 %. Havaitsemisraja vaihteli testillä lajikohtaisesti, jossa matalin havaitsemisraja todettiin *P. vivaxilla* sen ollessa 0.09 parasiittia/μl, kun taas korkein havaitsemisraja, 2,00 parasiittia/μl todettiin *P. ovalella* (31).

Tutkimuksessa todettu RealStar PCR-testin keskimääräinen aika valmiiseen tulokseen oli keskimäärin neljä tuntia, ja testin todettiin olevan yksinkertaisempi ja helppokäyttöisempi aiempaan PCR-referenssimenetelmään verrattuna. RealStar-PCR:n todettiin olevan selvästi herkempi malariainfektion osoittamisessa kuin perinteinen mikroskopia, jossa havaitsemisrajana malariainfektioille on pidetty n. 100 parasiittia/μl (31,32).

3.4.3 MC004-RT-PCR

MC004-RT-PCR on Hollannin yliopistollisessa sairaalassa kehitetty reaaliaikainen multiplex-PCR. MC004 perustuu malarian mitokondriaalisen DNA:n tunnistamiseen kolmen fluoresoivan merkkiaineen avulla, josta se luo sulamiskäyrän. Sulamiskäyrän avulla pystytään tekemään tarkka lajimääritys sekä muodostamaan arvio parasitemia-asteesta. Verinäytteenotosta kuluu arviolta 4 h tulosten valmistumiseen (33).

3.4.4 MC004-RT-PCR suorituskyky

V.2021 julkaistussa hollantilaisessa tutkimuksessa esiteltiin uusi hollantilaisen bioteknologiayrityksen kehittämä MC004-NhO-testi. Tutkimuksessa keskityttiin pääasiassa MC004-RT-PCR:n analysointiominaisuuksiin. Tutkimuksessa käytetyt näytteet olivat pääasiassa referenssinäytteitä, mutta mukana oli myös potilasnäytteitä ja synteettisiä näytteitä. Analysointitulokset osoittivat, että MC004 ei tuottanut vääriä positiivisia tai negatiivisia tuloksia. Testin tulosten avulla pystyttiin luomaan kalibrintikäyriä *P. falciparum* -infektion parasitemia-asteen määrittämiseksi. Tutkimuksessa ei määritelty, kuinka monesta näytteestä parasitemia-astetta määriteltiin, mutta tutkimustuloksien mukaan MC004-testi pystyi määrittämään parasitemia-asteen ja sen todettiin olleen riittävän tarkka erityisesti kriittisissä kohdissa, kuten 2 %:n parasitemia-asteessa. Parasitemia-astetta arvioitiin vertailemalla kalibrintikäyrien Cq-arvoja tiedettyihin mikroskooppisesti arvioituihin parasiittitiheyksiin. Tutkimuksessa mainittiin, että testin todellinen suorituskyky eri *Plasmodium*-

lajien ja parasitemia-asteiden osalta on vielä varmistettava tulevaisuudessa empiirisesti. Tutkimuksessa ei seurattu, kuinka pitkään näytteet säilyivät positiivisina verrattuna mikroskopiaan (33).

Hollantilaisessa v. 2023 julkaistussa tutkimuksessa verrattiin MC004 NhO-testin kliinistä suorituskykyä malarian havaitsemisessa ja tunnistamisessa mikroskopiaan ja RDT-antigeenitestiin. Tutkimus suoritettiin Hollannissa ja tutkimukseen kertyi 318 verinäytettä 304 potilaalta. Malaria osoitautui positiiviseksi 34 potilaalta ja MC004-testin herkkyys oli 100 % malarainfektioiden tunnistamisessa. Tutkimuksen mukaan perinteisellä mikroskopiolla olisi jäänyt yksi *P. vivax* -infektio huomaamatta. MC004-testi tunnsti kaikki infektiot, mutta lajintunnistuksessa se tunnsti kertaalleen sekainfektion yksittäiseksi infektioksi: *P. falciparum* ja *P. vivax* -sekainfektio oli virheellisesti identifioitu *P. falciparum* -infektioksi. Tutkimuksen tulosten mukaan MC004-testi pystyi havaitsemaan *Plasmodium*-DNA:ta, vaikka mikroskopiassa ei nähty enää parasiitteja, mutta tutkimus ei kuitenkaan eritellyt, missä kohtaa tämä ajallisesti tapahtui (34).

Tutkimuksessa seurattiin erikseen MC004-testin avulla hoidon vastetta kahdeksalta malariaan sairastuneelta potilaalta. Näiltä potilailta otettiin tiiviisti päivittäin näytteitä ja seurattiin aikaväliä, jonka aikana näytteet muuttuivat negatiivisiksi. MC004-testi antoi ensimmäistä kertaa negatiivisen tuloksen 7 päivän kuluttua malarialääkityksen aloittamisesta yhdelle *P. vivax* ja yhdelle *P. ovale* -tartunnan saaneelle potilaalle ja 4–20 päivän kuluessa *P. falciparum* -tartunnan saaneille. PCR-näytteet pysyivät mikroskopiaa pidempään positiivisina (34).

MC004-testin suorituskykyä parasitemia-asteen arvioinnissa vertailtiin mikroskopian kanssa määrittämällä parasitemia-aste 19 *P. falciparum* -näytteestä. MC004-testillä määritetyt parasitemia-asteet olivat 14 näytteessä mikroskopian määrittämän 95 %:n luottamusvälin sisällä ja verrannollisia mikroskopian lukemiin. Kuitenkin viidessä näytteessä, mukaan lukien kaksi korkeinta parasitemiatasoa (4,2 % ja 3,5 %), MC004-testin määrittämät tasot jäivät luottamusvälin ulkopuolelle. MC004-testin todettiin aliarvioivan yli 4 %:n parasitemia-asteen lukemia, joka on raja vaikealle malarialle (34).

Seuraavassa tutkimuksessa arvioitiin MC004-testin suorituskykyä *Plasmodium*-lajien havaitsemisessa ja erottelussa. Tutkimus suoritettiin Adaman malarian diagnosointi- ja hoitokeskuksessa Etiopiassa. Verinäytteitä kerättiin 150 potilaalta, joilla epäiltiin malariaa (35).

Tulosten mukaan malariainfektio havaittiin 59 näytteessä mikroskopiolla ja 62 näytteessä MC004-testillä. Kolme näytettä, jotka olivat negatiivisia mikroskopiolla, todettiin positiiviseksi MC004-testillä. Näistä infektiosta kaksi oli *P. vivax* ja yksi *P. falciparum* -infektio. Tutkimuksessa ei ollut malariapositiivisia potilaita, jotka olisivat olleet mikroskopian valossa positiivisia, mutta negatiivisia MC004-testillä. MC004 -testin herkkyys oli 100 % ja tarkkuus 96,7 % verrattuna mikroskopiaan. Kappa-arvo oli 95,8 %, mikä osoittaa MC004-testin olevan erittäin yhteneväinen tarkkuudessa ja herkkyydessä mikroskopiaan verrattuna. Mikroskopia tunnisti 7 sekainfektiota (*P. vivax* ja *P. falciparum*), mutta MC004 RT-PCR ei tunnistanut yhtään sekainfektiota. Kuusi näistä sekainfektioista tunnistettiin MC004-testillä monoinfektiona *P. vivaxiksi* ja yksi *P. falciparumiksi*. Kappa-arvo lajien tunnistamisessa oli 87,2 %, mutta sekainfektioita tunnistettaessa kappa-arvo oli 61 %. Tutkimuksessa ei keskitytty parasitemia-asteen seurantaan eikä tarkasteltu, kuinka pitkään malarianäytteet näkyivät positiivisina hoidon aloituksen jälkeen (35).

Tutkimuksen lopussa pohdittiin, että PCR:n suorituskyvystä sekainfektioiden tunnistamisessa on ristiriitaista tietoa, sillä osassa tutkimuksissa MC004-testin kyky tunnistaa sekainfektioita oli mikroskopiaa parempi, kun taas toisaalta osassa tutkimuksia MC004 on ollut heikompi sekainfektioiden tunnistamisessa. Syyksi tähän on ajateltu mm. menetelmälliset erot laboratorioden tutkimusprotokollissa, joita ei tarkemmin eritelty (35).

3.4.5 FRET RT-PCR

FRET RT-PCR (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) on reaaliaikaiseen nukleiinihappo-osoitukseen perustuva menetelmä, jossa jokaiseen koetinjuosteeseen on kiinnitetty fluoresoivaa merkkiainetta molemmille puolille juostetta. DNA:n monistuessa koetinjuosteet kiinnittyvät spesifisesti kohde-DNA:han saaden aikaan fluoresoivien molekyylien reagoinnin keskenään, joka rekisteröity PCR-laitteelle havaittavana valona. PCR-laite tulkitsee havaitun valon voimakkuuden ja sen muuttumisen ajan kuluessa, jonka avulla voidaan arvioida ilmentyneen DNA:n määrää ja tehdä arvio parasitemia-asteen määrittämiseen. Testin suoritusajaksi DNA:n eristämisestä valmiiseen tulokseen arvioitiin menevän keskimäärin alle kaksi tuntia (36).

3.4.6 FRET RT-PCR:n suorituskyky

Seuraavassa tutkimuksessa käydään läpi FRET RT-PCR:n kykyä tunnistaa malariainfektio luotettavasti sekä sen potentiaalia tulla uudeksi työkaluksi muiden Nho-testien ohelle malariainfektion tunnistamisessa ja parasitemia-asteen seurannassa. Tutkimus toteutettiin Englannissa vuosina 2016–2020 käyttäen FRET RT-PCR menetelmää verraten sitä standardisoituun PCR-menetelmään. Tutkimuksessa analysoitiin 56 referenssinäytettä, jotka oli testattu UK NEQASin (*United Kingdom National External Quality Assessment Service*) toimesta standardisoidulla PCR-menetelmällä ennen tätä tutkimusta. Kaikkiaan 56 näytteestä 46 oli positiivisia ja lajimääritys FRET RT-PCR:llä onnistui tarkasti. Kaikki kymmenen näytettä, jotka antoivat negatiivisen tuloksen, olivat DNA-näytteitä mm. *Leishmaniasta*, *Babesiasta*, *Pneumocystiksestä* ja *Toxoplasmasta*. Nämä DNA-näytteet eivät aiheuttaneet ristireaktiota FRET RT-PCR:ssä.

Kyseisen menetelmän suorituskykyä arvioitiin laimentamalla *P. falciparum* -näytteitä kymmenenkertaisella laimennuksella, josta saatiin selville, että FRET RT-PCR -menetelmällä pystytään havaitsemaan 200 parasiittia/ μ l verta. Sekainfektioita luotiin keinotekoisesti tutkimukseen yhdistämällä *P. falciparum* joko *P. vivaxin* kanssa tai *P. ovalen* kanssa. Menetelmä tunnisti kaikki sekainfektiot, eikä tutkimuksessa havaittu vääriä tuloksia. Lisäksi tutkimuksen tulosten mukaan FRET RT-PCR-menetelmää pystyttiin luotettavasti käyttämään parasitemia-asteen määrittämiseen. Arvio tehtiin vertailemalla Cp-arvoa tiedettyyn *P. falciparum* -määrään mikrolitraa kohden. Cp-arvoilla ja mikroskooppisesti määritettyjen parasiittitiheysarvojen välillä oli selvä korrelaatio. Tutkimuksen lopuksi todettiin, että parasiittitiheyden määrittäminen on FRET RT-PCR:llä tehokkaampaa ja vähemmän aikaa vievää kuin perinteisillä menetelmällä, etenkin hoidon ensimmäisen kolmen päivän aikana (37).

Yhdessä FRET RT-PCR:ää käsittelevässä julkaisussa käsiteltiin Nho-testin tuomia etuja ja haasteita tulevaisuuden diagnostiikassa. Julkaisussa pohdittiin, että tulevaisuudessa FRET-pohjainen PCR tarjoaisi tarkempaa malarialajien tunnistamista, määritystä ja parempaa parasitemia-asteen arviointia. Lisäksi FRET-biosensorien sovellusten parantuessa niiden odotetaan saavan merkittävän roolin malarian diagnostiikassa ja ihmisen terveyden parantamisessa. FRET-menetelmän haasteiksi mainittiin mm. epäspesifisen sitoutumisen aiheuttamat väärät positiiviset tulokset ja laitteiston puutteellinen kyky erottaa fluoresoivan signaalin lähde, joka voi vaikuttaa tulokseen (36).

3.4.7 TaqMan In-house PCR

TaqMan In-house PCR on kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR menetelmä, joka tunnistaa kaikki *Plasmodium*-lajit ja kykenee lajimääritykseen *P. falciparumin* suhteen. Se perustuu merkkiaineilla tapahtuvaan malarian 18S-rRNA-sekvenssin tunnistamiseen ja *P. falciparumille* spesifisen vargeenin tunnistamiseen. Menetelmä on kehitetty ranskalaisessa laboratoriossa, eikä se ole kaupallisesti saatavilla (38).

3.4.8 TaqMan In-House PCR:n suorituskyky

Ranskalaisen malarian referenssikeskuksen tutkimusryhmä julkaisi Malaria Journalissa v. 2022 tutkimuksen, jossa vertailtiin neljää kvantitatiivista RT-PCR-menetelmää ja mikroskopiaa keskenään. Tutkimuksen referenssimenetelmäksi valikoitui LAMP-menetelmään perustuva Alethia Malariae -NHO-testi. Tutkimuksessa vertailtiin kahta kaupallista PCR-testiä ja kahta laboratoriossa kehitettyä PCR-testiä keskenään. Vertailtavia PCR-testejä olivat Bio-Evolution qPCR, Ampliquick Malaria, In-House HRM ja In-House TaqMan. Julkaisun tutkimustuloksien mukaan In-House TaqMan qPCR -menetelmä oli vertailtavista PCR-menetelmistä herkin ja tarkin, sen herkkyuden ollessa 100 %. Tutkimuksen mukaan mikroskopian herkkyys oli 85,2 %, ja kaikki mikroskopiolla tunnistetut malariainfektiot pystyttiin tunnistamaan myös kaikilla neljällä PCR-testillä. Kaikki Alethia Malaria -testillä negatiiviset tulokset olivat negatiivisia myös neljällä vertailtavalla PCR-menetelmällä (38).

TaqMan-PCR pystyi tunnistamaan kaikki ne *P. falciparum* -infektiot, jotka jäivät havaitsematta kaupallisilla testisarjoilla, osoittaen sen erityisen vahvuuden malarian diagnosoinnin herkkyudessa. Tutkimuksessa havaittiin, että TaqMan-PCR-menetelmällä voidaan peilata parasiittitiheyttä CT-arvojen avulla. Tutkijat havaitsivat matalampien CT-arvojen vastaavan suurempaa parasiittitiheyttä (parasitemia-astetta) ja tämän avulla TaqManilla voitaisiin arvioida malariainfektion vakavuutta tarkemmin. Taqman PCR:llä kyettiin tarkkaan lajimääritykseen. TaqMan-PCR:n suorituskyky parasitemia-asteen määrittämisessä oli vahvistettu niin, että sen tuloksien CT-arvot osoittivat selkeää korrelaatiota mikroskopiolla määritettyjen

parasiittitiheyksien kanssa. Tutkimuksessa ei ollut mainintaa, kuinka pitkään tulokset näkyivät positiivisina hoidon aloituksen jälkeen (38).

3.4.9 18S qPCR

18S qPCR on kvantitatiivinen RT-PCR-testi, jossa voidaan mitata DNA:n määrää näytteessä reaaliajassa käyttäen fluoresoivaa merkkiainetta, joka antaa signaalin, kun se liittyy oikeaan DNA-kohtaan. Yksinkertaistettuna kohde DNA:n pätkä sitoutuu merkkaineeseen PCR:n aikana, jossa se hydrolysoituu liittyessään ja vapauttaa fluoresoivan signaalin. Tämän signaalin avulla pystytään arvioimaan DNA-määrää ja näin parasiittitiheyttä (39).

3.4.10 18S qPCR:n suorituskyky

Vuonna 2019 *Tropical Medicine and Health* -lehdessä julkaistussa tutkimuksessa vertailtiin 18S qPCR:n suorituskykyä parasitemia-asteen määrittämisessä *P. falciparum* -infektioissa. Kyseessä oli 2a-vaiheen tutkimus, jossa käsiteltiin potilaita, joilla oli komplisoitumaton *P. falciparum* -infektio. Tutkimus toteutettiin 740 verinäytteestä ja jokaisesta näytteestä suoritettiin kokoneiden mikroskopijien toimesta parasiittitiheyden laskenta sively- ja paksupisaranäytteistä. Tutkimuksessa 18S qPCR:n DNA:n havaitsemisraja oli 22 parasiittia/ μ l. Tutkimuksessa kaikki mikroskopiassa positiiviset näytteet olivat myös qPCR:llä positiivisia (40).

Tutkimuksessa keskimääräinen parasitemia-arvo näytteissä oli 810 parasiittia/ μ l ja Log 10 parasitemia-arvo 5,81 log₁₀-yksikköä/ml. 18S qPCR:llä parasitemia-arvo oli 5,86 log₁₀-yksikköä/ml ja sisäinen korrelaatiokerroin (*intraclass correlation coefficient*, ICC) 0,965 osoittivat erinomaista johdonmukaisuutta mikroskopian ja qPCR-menetelmän välillä. Tutkimuksen mukaan 18S qPCR testi ei kykene erittäin matalan parasitemia-asteen kohdalla varmuudella erottamaan, onko kohde-DNA peräisin elävästä vai kuolleesta parasiitista. Testi ei myöskään pysty erottamaan onko kohde-DNA peräisin soluvapaasta DNA:sta (40).

4. Pohdinta

Laboratoriovarmennetuista malariainfektioista suurin osa todetaan malarian kotoperäisillä alueilla, joissa diagnostiikka tapahtuu pääasiassa mikroskopian ja RDT-testien avulla näiden hyvästä kustannushyötysuhteesta johtuen (2). Malarian kotoperäisillä alueilla toimivilla mikroskopioijilla on suuri etu mikroskopiakokemuksen kerryttämisessä, sillä toistoa ja oikeita malariatapauksia tulee paljon enemmän verrattuna matalan ilmaantuvuuden alueilla toimiviin laboratoriotyöntekijöihin. Matalan ilmaantuvuuden alueilla malariaepäilyjä tulee merkittävästi vähemmän, minkä seurauksesta mikroskopiaosaamisen kerryttäminen on haastavampaa ja diagnostiikkaa joudutaan osin keskittämään referenssilaboratorioihin. Tämä voi asettaa harvaan asutettujen alueiden malariapotilaiden diagnostiikan ja hoidon epätasa-arvoisempaan asemaan, sillä tulosten saaminen voi olla viiveellistä.

Vaihtoehtoisten diagnostisten välineiden, kuten NhO-testien avulla kyetään tunnistamaan malariainfektio herkästi ja menetelmästä riippuen mahdollisesti määrittämään taudin aiheuttava *Plasmodium*-laji sekä taudin vaikeusaste. Nämä menetelmät eivät kuitenkaan kykene korvaamaan mikroskopiaa useiden tekijöiden vuoksi, joita ovat mm. riittämätön tieto suorituskyvystä, pidempi suoritusaika potilasnäytteestä valmiiseen tulokseen, niiden kompleksisuuden vuoksi vaadittava asianmukainen laboratorio-osaaminen ja kouluttautuminen sekä laitteistojen kalliit hinnat.

Katsauksessa käytiin läpi käytössä olevia ja kehitteillä olevia NhO-testejä, keskittyen erityisesti niiden suorituskyvyn. Niiden toimintamekanismeissa sekä suorituskyvystä todettiin vaihtelua. Suorituskyvyn havaittiin olevan yleisesti parempi malariainfektioiden tunnistamisessa, mutta yksi epäkohdista oli tutkimuksien ristiriitainen tieto NhO-testien kyvystä tunnistaa sekainfektioita (28,29,31).Tämän lisäksi yhdessä NhO-menetelmässä osoitettiin puute, sillä se ei kyennyt tunnistamaan *P. knowlesi* infektiota, joka ymmärrettävästi rajoittaa sen käyttöä Aasiassa (30).

Tarkkoja kustannusarvioita NhO-testeistä käsiteltiin varsin niukasti ja tutkimuksissa lähinnä todettiin NhO-testien olevan kalliimpia perinteiseen mikroskopialla tapahtuvaan diagnostiikkaan verrattuna mm. kalliiden koulutusten, laitteistojen hintojen ja ylläpidon vuoksi. Suoritusajat vaihtelivat runsaasti, eikä tarkkoja aikoja kerrottu kaikkien menetelmien osalta. Suoritusajat vaihtelivat 2 h ja 4 h välillä (34,37).

Monet NhO-testit kykenivät vielä havaitsemaan näytteen malariaplasmodin suhteen positiiviseksi, vaikka mikroskopiassa ei havaittu plasmodeja. Tämä voi olla merkittävää joissakin tapauksissa, kuten lääkehoidon jatkon arvioinnissa potilailla, joilla infektio on edelleen aktiivinen negatiiviseksi jääneestä mikroskopiaseurannasta huolimatta, sekä tilanteissa, jossa potilaalla todetaan matalan parasitemia-asteen infektio, joka jäisi mikroskopiolla havaitsematta. Toisaalta NhO-testit eivät kykene erottamaan onko DNA peräisin kuolleesta vai elävästä parasiitista ja tästä johtuen tulokset voivat säilyä pitkään positiivisina esim. soluvälitilassa olevasta kuolleiden parasiittien DNA:sta johtuen (28,30,31,33). Tutkimustietoa hoitovasteen seurannassa saadun positiivisen tuloksen kliinisestä merkittävydestä tarvitaan tulevaisuudessa.

Jotta NhO-testit voisivat tulevaisuudessa kokonaan korvata mikroskopian matalan ilmaantuvuuden alueilla, tarvitaan tulevaisuudessa vielä lisää tutkimuksia, joissa käsitellään mm. NhO-testien kykyä arvioida infektion vaikeusastetta, positiivisten tuloksien kliinistä merkitystä hoitovasteen arvioinnissa ja kykyä tunnistaa sekainfektioita sekä niiden kustannustehokkuuden arviointia mikroskopiaan verrattuna ja niistä aiheutuvan viiveen merkitystä hoidon toteutuksessa.

Lähdeluettelo

1. H.Siitamäki et. H.Kyrönseppä. Malaria [Internet]. [Viitattu 3.10.2023. Saatavilla: <https://www.duodecimlehti.fi/duo92231>
2. Health Organization W. Guideline WHO Guidelines for malaria - 14 March 2023. 2023 [Viitattu 3.10.2023]; Saatavilla: <http://apps.who.int/bookorders>.
3. Global Malaria Programme. [viitattu 2023 Oct 3]; Saatavilla: https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/44124/9789241598088_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y
4. H.Siikamäki, N.Friberg, V.Holmberg. Malarian diagnoosi ja hoito [Internet]. [viitattu 3.10.2023]. Saatavilla: <https://www.terveysportti.fi/apps/dtk/ltk/article/ykt00037>
5. H.Siikamäki, S.Jokiranta, Seppo Meri. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 1. 4., uud. painos. Plasmodium. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 2020 [viitattu 3.10.2023]. Plasmodium - Duodecim Oppiportti. Saatavilla: <https://www.oppiportti.fi/op/mbg00266/do>
6. Tartuntatautirekisteri. 2023.. Malarian esiintyvyys - THL. [viitattu 3.10.2023] Saatavilla: <https://thl.fi/fi/web/infektiaudit-ja-rokotukset/taudit-ja-torjunta/taudit-ja-taudinaiheuttajat-a-o/malaria/malarian-esiintyvyys>
7. European Centre for Disease Prevention and Control. SURVEILLANCE REPORT Malaria. [viitattu 3.10.2023]; Saatavilla: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/malaria-annual-epidemiological-report-2021.pdf>
8. Milner DA. Malaria Pathogenesis. Cold Spring Harb Perspect Med [Internet]. 2018 Jan 1 [viitattu 3.10.2023];8(1). Saatavilla: </pmc/articles/PMC5749143/>

9. European Centre for Disease Prevention and Control. Facts about malaria [Internet]. [viitattu 3.10.2023]. Saatavilla: <https://www.ecdc.europa.eu/en/malaria/facts>
10. E. Aho-Laukkanen, P. Holma, J. Kauranen, A-M. Kerttula, L. Simola, H. Kauma, et al. Duodecim 2021;137(2):187-91. 2021 [viitattu 3.10.2023]. Nukleiinihaponosoitustestillä nopeaa ja luotettavaa malariadiagnostiikkaa. Saatavilla: <https://www.duodecimlehti.fi/duo16022>
11. A-M. Kerttula, A. Lavikainen. Duodecim 2017;133(8):742-8. 2017 [viitattu 3.10.2023]. Nukleiinihapon osoitus parasitologisessa diagnostiikassa. Saatavilla: <https://www.duodecimlehti.fi/duo13655>
12. Menetelmämuutos malariadiagnostiikassa - laboratoriotiedote [Internet]. [viitattu 3.10.2023]. Saatavilla: https://www.islab.fi/wp-content/uploads/2022/10/9-Menetelmämuutos-malariadiagnostiikassa_2021_02_18.pdf
13. Kavanaugh MJ, Azzam SE, Rockabrand DM. Malaria Rapid Diagnostic Tests: Literary Review and Recommendation for a Quality Assurance, Quality Control Algorithm. *Diagnostics* 2021, Vol 11, Page 768 [Internet]. 2021 Apr 25 [viitattu 3.10.2023] 11(5):768.; Saatavilla: <https://www.mdpi.com/2075-4418/11/5/768/htm>
14. Fimlab tutkimusohjekirja: PLASMIDIUM (KVAL) [Internet]. [viitattu 26.10.2023]. Saatavilla: <https://fimlab.fi/tutkimus/6662>
15. ISLAB tutkimusohjekirja: E -Plasmodium (kval) [Internet]. [viitattu 29.11.2023]. Saatavilla: <http://webohjekirja.mylabservices.fi/ISLAB/index.php?test=2316>
16. CDC - DPDx - Diagnostic Procedures - Blood Specimens [Internet]. [viitattu 4.10.2023]. Saatavilla: <https://www.cdc.gov/dpdx/diagnosticprocedures/blood/microexam.html>
17. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2000 Jun 15 [viitattu 3.10.2023];28(12):e63–e63. Saatavilla: <https://dx.doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
18. Real-time PCR | Functional genomics II [Internet]. [viitattu 2023 Oct 17]. Saatavilla: <https://www.ebi.ac.uk/training/online/courses/functional-genomics-ii-common-technologies-and-data-analysis-methods/real-time-pcr/>
19. Kitamura M, Kubo S, Tanaka J, Adachi T. Rapid screening method for male DNA by using the loop-mediated isothermal amplification assay. *Int J Legal Med* [Internet]. 2018 Jul 1 [viitattu 3.10.2023];132(4):975–81. Saatavilla: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00414-017-1661-z>
20. Wangai LN, Karau MG, Njiruh PN, Sabah O, Kimani FT, Magoma G, et al. Sensitivity of Microscopy Compared to Molecular Diagnosis of *P. Falciparum*: Implications on Malaria Treatment in Epidemic Areas in Kenya. *Afr J Infect Dis* [Internet]. 2011 [viitattu 3.10.2023];5(1):1. Saatavilla: </pmc/articles/PMC3497842/>
21. Johnston SP, Pieniazek NJ, Xayavong M V., Slemenda SB, Wilkins PP, Da Silva AJ. PCR as a Confirmatory Technique for Laboratory Diagnosis of Malaria. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2006 Mar [viitattu 3.10.2023];44(3):1087. Saatavilla: </pmc/articles/PMC1393165/>
22. Martín-Ramírez A, Lanza M, Hisam S, Perez-Ayala A, Rubio JM. Usefulness of a commercial LAMP assay for detection of malaria infection, including *Plasmodium knowlesi* cases, in returning travelers in Spain. *BMC Res Notes* [Internet]. 2022 Dec 1 [viitattu 17.10.2023];15(1). Saatavilla: </pmc/articles/PMC9036737/>

23. Ljolje D, Abdallah R, Lucchi NW. Detection of malaria parasites in samples from returning US travelers using the Alethia® Malaria Plus LAMP assay. *BMC Res Notes* [Internet]. 2021 Dec 1 [viitattu 17.10.2023];14(1). Saatavilla: [/pmc/articles/PMC8028069/](#)
24. Ponce C, Kaczorowski F, Perpoint T, Mialhes P, Sigal A, Javouhey E, et al. Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for screening patients with imported malaria in a non-endemic setting. *Parasite* [Internet]. 2017 [viitattu 17.10.2023];24. Saatavilla: [/pmc/articles/PMC5734902/](#)
25. Gadkar VJ, Goldfarb DM, Gantt S, Tilley PAG. Real-time Detection and Monitoring of Loop Mediated Amplification (LAMP) Reaction Using Self-quenching and De-quenching Fluorogenic Probes. *Sci Rep* [Internet]. 2018 Dec 1 [viitattu 18.10.2023];8(1). Saatavilla: [/pmc/articles/PMC5883045/](#)
26. Farrugia C, Cabaret O, Botterel F, Bories C, Foulet F, Costa JM, et al. Cytochrome b Gene Quantitative PCR for Diagnosing Plasmodium falciparum Infection in Travelers. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2011 Jun [viitattu 18.10.2023];49(6):2191. Saatavilla: [/pmc/articles/PMC3122771/](#)
27. Th X, Emop. PCR-BASED METHODS TO THE DIAGNOSIS OF IMPORTED MALARIA. 2008 [viitattu 18.10.2023];15:484–8. Saatavilla: <http://dx.doi.org/10.1051/parasite/2008153484>
28. Nijhuis RHT, van Lieshout L, Verweij JJ, Claas ECJ, Wessels E. Multiplex real-time PCR for diagnosing malaria in a non-endemic setting: a prospective comparison to conventional methods. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* [Internet]. 2018 Dec 1 [viitattu 18.10.2023];37(12):2323–9. Saatavilla: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10096-018-3378-4>
29. Wardhani P, Butarbutar TV, Adiatmaja CO, Betaubun AM, Hamidah N, Aryati. Performance comparison of two malaria rapid diagnostic test with real time polymerase chain reaction and gold standard of microscopy detection method. *Infect Dis Rep* [Internet]. 2020 Jul 7 [viitattu 18.10.2023];12(Suppl 1). Saatavilla: [/pmc/articles/PMC7447940/](#)
30. Frickmann H, Wegner C, Ruben S, Behrens C, Kollenda H, Hinz R, et al. Evaluation of the multiplex real-time PCR assays RealStar malaria S&T PCR kit 1.0 and FTD malaria differentiation for the differentiation of Plasmodium species in clinical samples. *Travel Med Infect Dis*. 2019 Sep 1;31:101442 [viitattu 18.10.2023].
31. Ramírez AM, Tang THT, Suárez ML, Fernández AÁ, García CM, Hisam S, et al. Assessment of Commercial Real-Time PCR Assays for Detection of Malaria Infection in a Non-Endemic Setting. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2021 Dec 1 [viitattu 20.10.2023];105(6):1732–7. Saatavilla: <https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/105/6/article-p1732.xml>
32. Britton S, Cheng Q, McCarthy JS. Novel molecular diagnostic tools for malaria elimination: A review of options from the point of view of high-throughput and applicability in resource limited settings. *Malar J* [Internet]. 2016 Feb 16 [viitattu 15.10.2023];15(1):1–8. Saatavilla: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-016-1158-0>
33. van Bergen K, Stuitje T, Akkers R, Vermeer E, Castel R, Mank T. Evaluation of a novel real-time PCR assay for the detection, identification and quantification of Plasmodium species causing malaria in humans. *Malar J* [Internet]. 2021 Dec 1 [viitattu 6.10.2023];20(1):1–12. Saatavilla: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-021-03842-8>
34. van Bergen KJM, Stuitje AR, Akkers RC, Vermeer HJ, Castel R, Mank TG. Performance of a novel melting curve-based qPCR assay for malaria parasites in routine clinical practice in non-endemic setting. *Malar J* [Internet]. 2023 Dec 1 [viitattu 6.10.2023];22(1):1–10. Saatavilla: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-023-04617-z>

35. Beyene MB, Teshome S, Yehenew A, Terefework Z, Stuitje AR, Abebe T, et al. Assessing the diagnostic performance of a novel RT-PCR fluorescence method for the detection of human plasmodium species. PLoS One [Internet]. 2022 Aug 1 [viitattu 6.10.2023];17(8). Saatavilla: /pmc/articles/PMC9352105/
36. Verma AK, Noumani A, Yadav AK, Solanki PR. FRET Based Biosensor: Principle Applications Recent Advances and Challenges. Diagnostics [Internet]. 2023 Apr 1 [viitattu 12.10.2023];13(8). Saatavilla: /pmc/articles/PMC10136898/
37. Schneider R, Lamien-Meda A, Auer H, Wiedermann-Schmidt U, Chiodini PL, Walochnik J. Validation of a novel FRET real-time PCR assay for simultaneous quantitative detection and discrimination of human Plasmodium parasites. PLoS One [Internet]. 2021 Jun 1 [viitattu 12.10.2023];16(6). Saatavilla: /pmc/articles/PMC8177637/
38. Bouzayene A, Zaffaroullah R, Bailly J, Ciceron L, Sarrasin V, Cojean S, et al. Evaluation of two commercial kits and two laboratory-developed qPCR assays compared to LAMP for molecular diagnosis of malaria. Malar J [Internet]. 2022 Dec 1 [viitattu 4.10.2023];21(1):204. Saatavilla: /pmc/articles/PMC9238120/
39. Overview: Types of PCR Probes | GoldBio [Internet]. [viitattu 12.10.2023]. Saatavilla: https://goldbio.com/articles/article/Overview-Types-PCR-Probes#_Toc104454007
40. Ballard E, Wang CYT, Hien TT, Tong NT, Marquart L, Pava Z, et al. A validation study of microscopy versus quantitative PCR for measuring Plasmodium falciparum parasitemia. Trop Med Health [Internet]. 2019 Aug 27 [viitattu 12.10.2023];47(1). Saatavilla: /pmc/articles/PMC6712708/