

# Novosti u laboratorijskoj dijagnostici malarije

---

**Bekić, Viktor**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:237920>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-18**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Viktor Bekić

# Novosti u laboratorijskoj dijagnostici malarije

Diplomski rad



Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Marija Svibena, prim. dr.med; i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2022./2023.

## SADRŽAJ

Sažetak.....	i
Summary.....	ii
1 Uvod .....	1
2 Biologija plazmodija.....	6
2.1 Životni ciklus.....	6
2.2 Stanična građa merozoita .....	12
2.3 Život u eritrocitu .....	14
2.4 Prehrana.....	17
3 Klinička obilježja malarije .....	18
3.1 Klinička slika.....	18
3.2 Rekrudescencija, recidiv i reinfekcija .....	21
4 Laboratorijska dijagnostika malarije.....	22
4.1 Svjetlosna mikroskopija .....	22
4.2 Brzi dijagnostički (antigenski) testovi.....	26
4.3 Serološka dijagnostika.....	28
4.4 Dijagnostika temeljena na hemozoinu .....	29
4.5 Molekularna dijagnostika .....	32
4.6 Aptamerima posredovana dijagnostika .....	35
Zahvale .....	36
Literatura .....	37
Životopis.....	51

## Sažetak

### NOVOSTI U LABORATORIJSKOJ DIJAGNOSTICI MALARIJE

Viktor Bekić

Malarija, kao jedan od vodećih svjetskih javnozdravstvenih problema, 2021. godine dovela je do 619 000 smrtnih slučajeva. Globalni utjecaj malarije mogao bi se smanjiti boljom kontrolom bolesti za koju je potrebna pravovremena i ispravna dijagnoza. Od otkrića samog uzročnika bolesti pa do danas, svjetlosna mikroskopija uzoraka krvi i dalje ostaje zlatni standard u dijagnostici, no njome je teško odrediti bolesti s niskom razinom parazitemije što otežava nastojanja njene eradikacije. Shodno tome, razvijaju se brojne nove imunokromatografske i molekularne metode u borbi protiv malarije. Integracijom laboratorijskih metoda na prijenosne uređaje koji bi omogućili primjenu na terenu nastoji se pružiti bolji pristup malariji u područjima s ograničenim resursima. Ovaj pregledni rad osvrće se na laboratorijske metode korištene u rutinskoj dijagnostici, na nove eksperimentalne metode tek u nastajanju, kao i na biologiju uzročnika *Plasmodium spp.*, čije je poznavanje nužno za optimizaciju dijagnostičkih metoda.

Ključne riječi: malarija, dijagnostika, laboratorijske metode, molekularna dijagnostika, *Plasmodium spp.*

## Summary

### NOVELTIES IN LABORATORY DIAGNOSTICS OF MALARIA

Viktor Bekić

Malaria, as one of the leading global public health challenges, lead to 619,000 deaths in 2021. The global impact of malaria could be reduced through improved disease control, which requires timely and accurate diagnosis. Since the discovery of its causative agent, light microscopy of blood samples has remained the gold standard for diagnostics. However, it faces challenges in detecting infections with low parasitemia, making eradication efforts difficult. Hence, numerous new immunochromatographic and molecular methods are being developed in the fight against malaria. Integrating laboratory methods into portable devices for field application aims to provide better access to malaria diagnostics in resource-limited areas. This review focuses on laboratory methods used in routine diagnostics, emerging experimental approaches, along with the biology of *Plasmodium spp.*, knowledge of which is crucial for optimizing diagnostic methods.

Key words: malaria, diagnostics, laboratory methods, molecular diagnostics, *Plasmodium spp.*

# 1 Uvod

Otkako ih je glasoviti francuski liječnik Charles Louis Alphonse Laveran po prvi puta uočio pod svjetlosnim mikroskopom, gledajući uzorak krvi jednog febrilnog vojnika, u Alžiru 20. listopada, 1880. godine,<sup>1</sup> krvno-tkivni paraziti roda *Plasmodium* tvrdoglavo nastavljaju tamarati svijetom uzrokujući malariju. Riječ malarija potiče od talijanske fraze „*mala aria*“ (hrv. loš zrak) i ima podlogu u teoriji mijazme (grč. *μίασμα*; onečišćenje, oskvrnuće) prema kojoj su bolesti uzrokovane u čovjeka posljedica lošega zraka tj. otrovnih para ispunjenih česticama raspadnute tvari. Pojam *mal'aria* nije se koristio u znanstvenoj literaturi sve do 19. stoljeća, no kao bolest pod nazivima kao što su *močvarna*, *tercijarna* i *kvararna groznica* poznata je ljudskoj vrsti još od antičkoga vremena.<sup>2,3</sup>

Malarija je vektorska bolest koju prenose ženke komarca roda *Anopheles* (grč. *ἀνοφέλης*; beskoristan).<sup>4,5</sup> Komarci se hrane biljnim šećerima nektara koji su im bitan izvor energije, no za ženke komaraca još je jedna prehrambena namirnica iznimno važna - krv. Osim kao izvor energije, krv, zbog njenog proteinskog sadržaja, u gotovo svih vrsta komaraca esencijalna je za razvoj jajašaca.<sup>6</sup> Kada se ženka zaražena parazitom nahrani krvlju, može ga prenijeti u tkivo domaćina i time započeti njegov ciklus nespolnog razmnožavanja, putem kojega će, oštećujući crvene krvne stanice, dovesti do pojave simptoma bolesti malarije. Uzročnik same malarije je protozoa, roda *Plasmodium*. Plazmodiji su jednostanični eukarioti iz porodice *Plasmodiidae* i šire skupine organizama Apicomplexa (sl. 1), prethodno zvanima sporozoi. Organizmi te skupine unutarstanični su paraziti karakterizirani prisustvom tzv. apikalnog kompleksa - skupine strukturnih komponenti i sekretornih organela koje omogućuju invaziju stanica domaćina. Druga bitna karakteristika tih organizama je specifični proces nespolnog razmnožavanja nazvan shizogonija, kojime se jedna stanica ponavljano dijeli stvarajući time brojne stanice kćeri (merozoite) unutar stanice domaćina.<sup>7</sup> Poznato je više od 200 različitih vrsta koje pripadaju rodu *Plasmodium* i uzrokuju bolest u sisavaca i drugih kralježnjaka, no svega nekoliko njih može uzrokovati infekciju u čovjeka,<sup>5</sup> a za pet je vrsti glavni rezervoar zaraze, kao i prijelazni domaćin, upravo čovjek; to su: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale wallikeri*, *Plasmodium ovale curtisi* i *Plasmodium malariae*.<sup>8-10</sup> Osim navedenih, zabilježeno je još sedam drugih vrsta plazmodija kojima su rezervoar ne-ljudski primati, a da mogu uzrokovati malariju u čovjeka (tzv. zoonotsku malariju); i to su: *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium cynomolgi*, *Plasmodium simium*, *Plasmodium inui*, *Plasmodium brasilianum*, *Plasmodium eylesi* te *Plasmodium schwetzi*.<sup>11-13</sup> Najznačajniji uzročnik zoonotske malarije je *P. knowlesi*. Njegov prirodni rezervoar čine javanski (*Macaca fascicularis*) i svinjorepi (*Macaca nemestrina*) makaki majmuni, u kojih dovodi do blage i prolazne bolesti s kroničnom i niskom vrijednosti parazitemije. Premda je opisan još 1927., *P. knowlesi* je pridobio pažnju tek 2004. godine, od kada je pokazano da

redovito uzrokuje infekcije na otoku Borneo kao i na širem području jugoistočne Azije. Iako prijenos s čovjeka na čovjeka još nije zabilježen, zbog učestalosti njegovih infekcija, filogenetskom srodstvu s *P. vivax* i morfološkim sličnostima s *P. malariae*, na *P. knowlesi* može se gledati kao na uzročnika humane malarije.<sup>14</sup> Uz njega, moguće su spontano stečene infekcije u prirodi i drugim vrstama, poput *P. simium*, *P. brasilianum* i *P. cynomolgi*, za kojega je 2011. godine po prvi puta opisan slučaj takve prirodno stečene infekcije. Malaria uzrokovana tom vrstom, najčešće je asimptomatska ili s vrlo blagom kliničkom slikom, zbog čega, kao i zbog mikroskopski identičnog morfološkog izgleda s *P. vivax*, postoji pretpostavka da je incidencija infekcije tim uzročnikom značajno veća nego što se prethodno smatralo.<sup>11</sup> Tu se stoga ističe važnost korištenja molekularnih dijagnostičkih metoda poput lančane reakcije polimerazom (PCR; engl. *polymerase chain reaction*) u razlikovanju pojedinih uzročnika zoonotske malarije za koje se pretpostavlja da će se sve češće pojavljivati. Uslijed velikog rasta u broju ljudske populacije, potrebe za hranom i potražnjom poljoprivrednih zemljišta, industrijskim rastom država i posljedičnim krčenjem šuma, čovjek sve češće stupa u kontakt s divljinom i njenim stanovnicima. Kako se zbog navedenih čimbenika smanjuju populacije majmununa kao prirodnih domaćina određenih vrsta anofelesa (i plazmodija), kao svojevrsnu prilagodbu na navedene promjene u njihovom okolišu, komarci koji inače ne pokazuju antropofiliju, sve se češće hrane krvlju čovjeka i time omogućuju pojavu novih vrsta zoonotske malarije.<sup>12</sup>



**Slika 1;** Filogenetsko stablo plazmodija.<sup>7</sup>

Pojavnost malarije na nekome području uvelike ovisi o staništu njenog vektora, komarcu roda *Anopheles*. Tome rodu pripada više od 460 različitih vrsta, čijih približno 70 ima sposobnost prenositi uzročnike ljudske malarije. Neki od dominantnih tj. najčešćih vektora malarije su: *Anopheles gambiae*, *Anopheles funestus* i *Anopheles arabiensis* za područje Afrike; *Anopheles darlingi*, *Anopheles pseudopunctipennis* i *Anopheles albimanus* na područjima centralne i južne Amerike; *Anopheles sinensis*, *Anopheles stephensis*, *Anopheles dirus*, *Anopheles minimus* i dr. za područje Azije.<sup>15</sup> Rasprostranjenost samih komaraca na nekome području mijenja se tijekom vremena, a ona ovisi o osobitostima okoliša koji utječu na njihovu sposobnost razmnožavanja, odnosno odlaganja jaja. Za mjesto odabrano za odlaganje jaja ključno je prisustvo vode, kao i utjecaj okolnih čimbenika poput temperature, količine padalina, saliniteta

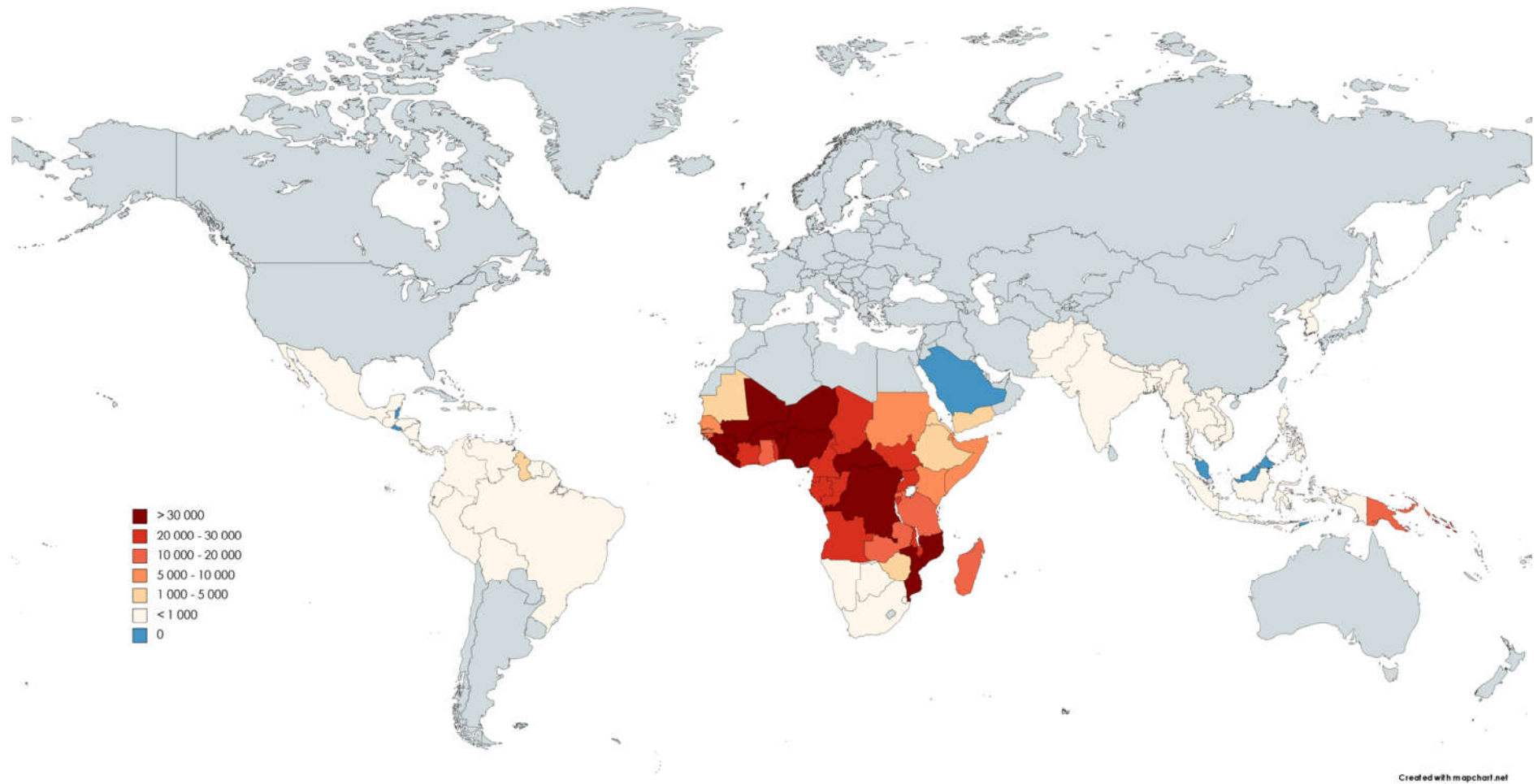


vode, količine sunčeve svjetlosti i okolne vegetacije. Pojedine vrste komaraca zahtijevaju različite karakteristike njihova staništa, a odabrana vodna tijela mogu biti npr. jezera, močvare, bočate vode mangrovih šuma, vode za irigaciju rižinih polja kao i druge akumulacije voda poput poplavljenih obala rijeka, obala potoka i kanala ili pak lokve nastale zbog kiše.<sup>16,17</sup> Glede samoga vektora, njegovi obrasci hranjenja i razmnožavanja, rezistencija na insekticide kao i domet leta svi čine čimbenike koji će, uz karakteristike čovjeka kao i samoga plazmodija, u međudjelovanju s okolišem u kojemu se nalaze, činiti sustav utjecaja na pojavnost malarije. Okoliš ima svoje inherentne sastavnice poput temperature, vlage zraka, količine padalina i prisustva prirodnih katastrofa, ali i stečenu komponentu nastalu djelatnošću čovjeka, odnosno urbanizaciju, izgradnju željeznica, cesta, brana, krčenja šuma, poljoprivrede i sl. Temperatura je bitna za razvoj komaraca, ali i parazita, te je kao takva bitna kao konstantna varijabla u održivosti malarije nekoga područja. Temperatura utječe na sposobnost odvijanja sporogonije tj. djela parazitarnog ciklusa koji se odvija u komarcu. Malarija se uspijeva održavati pri temperaturama između 16°C i 34°C (razlikuju se za pojedine vrste plazmodija), s optimalnom vrijednosti na otprilike 25°C. Pri temperaturama nižim od 16°C sporogonija se zaustavlja te je širenje malarije nemoguće. Tako će regije s konstantnom temperaturom višom od minimalne pokazivati pojavljivanje malarije tijekom cijele godine, dok će druge regije s izmjenama godišnjih doba imati sezonske epidemije. Ne začuđuje stoga, da su regije najviše zahvaćene malarijom upravo unutar tropskog pojasa, čiji uvjeti najviše odgovaraju istoj. Promjene u učestalosti i intenzitetu padalina mogu stvoriti uvjete koji će facilitirati razvoj i razmnožavanje komaraca, no isto tako mogu dovesti do promjena koje će negativno djelovati na njih, mijenjajući npr. temperaturu i salinitet vode. Osim okoliša, značajke samog plazmodija (duljina trajanja infekcije, rezistencija na antimalarike) kao i čovjeka (urođena i stečena imunost, edukacija, prevencija, liječenje, politička stabilnost države) imaju značajan utjecaj u tom sustavu pojavnosti malarije.<sup>18,19</sup>

Rizik za pojavnost autohtonih slučajeva malarija na nekome novom području ili području gdje je bila eradicirana (tzv. malariogenični potencijal) uvjetovan je istim čimbenicima koji se mogu kategorizirati kao *prijemčivost* odnosno prisustvo kompetentnog vektora i održivih okolišnih uvjeta, *infektivnost* tj. podložnost vektora da bude inficiran nekom vrstom plazmodija i *vulnerabilnost* tj. uvođenje i održavanje ljudskog rezervoara koji prenosi gametocite plazmodija komarcu. Glede malarije u Europi, iako je bila eradicirana tijekom 20. stoljeća i posljedično dovela do značajnog pada u broju *Anopheles* komaraca na njenom području, njihovo prisustvo nije bilo u potpunosti iskorijenjeno te se tijekom vremena brojnost populacije komaraca oporavila. U većem dijelu Europe, gdje je povijesno bila prisutna malarija, komarci roda *Anopheles* i dalje obitavaju (engl. *anophelism without malaria*), dapače ubikvitarni su. Nekoliko se vrsta smatra dominantnim vektorima, a to su: *Anopheles atroparvus* za sjevernu, zapadnu i centralnu Europu, *Anopheles labranchiae* za južnu Europu, *Anopheles superpictus* za jugoistočnu Europu i

*Anopheles sacharovi* najviše za područje Grčke.<sup>15</sup> Naime, kako se brojni okolišni čimbenici mijenjaju uslijed globalnog zatopljenja poput rasta temperature, veće količine padalina i sve češćih ekstremnih vremenskih prilika poput suša i valova vrućine, moguće je dodatno povećanje broja i promjena u distribuciji odgovarajućih vektora uz koje se stvaraju dobri uvjeti za prijemčivost malarije. Budući da se godišnje povećava broj importiranih slučajeva zbog internacionalnih putovanja kao i imigracije, pojava novih lokalnih epidemija stvarna je opasnost. Tijekom posljednjih 30 godina opisani su brojni slučajevi takvog lokalnog širenja na područjima Njemačke, Nizozemske, Španjolske, Francuske, Italije, Turske i Grčke, u kojoj su 2011. godine bila zabilježena 42 slučaja.<sup>20</sup> Dok su *P. falciparum*, *P. vivax* i *P. malariae* bili endemski prisutni u Europi, budući da su klimatski uvjeti južne Europe i Mediterana karakterizirani vrućim i suhim ljetima te prohladnim i vlažnim zimama, malarija je pratila sezonski obrazac pojavljivanja. Kako se ti uvjeti mijenjaju, budućnost je malarije u Europi neizvjesna i njena bi ponovna pojava sezonskih epidemija u budućnosti mogla biti moguća.<sup>20</sup>

Prema procjeni Svjetske zdravstvene organizacije, u 84 endemske države zabilježeno je oko 247 milijuna kliničkih slučajeva malarije u 2021. godini. Nakon više godina stabilnog pada, incidencija malarije, počevši od 2016. godine, bilježi stalan porast slučajeva. Najveće je povećanje bilo zabilježeno između 2019. i 2020. godine, odnosno tijekom prve godine pandemije virusa COVID-19. Ukupno se smatra da bi se dodatnih 13,4 milijuna slučajeva moglo pripisati toj pandemiji. Unatoč tome, između 2020. i 2021. godine nije bilo porasta u incidenciji. Procjenjuje se da je 2021. godine od malarije umrlo 619 000 osoba, od čega 76.8% čine djeca mlađa od 5 godina. Od 84 endemskih zemalja u kojima se pojavljuju autohtoni slučajevi malarije, njih četiri su odgovorne za gotovo 50% slučajeva: Nigerija, Demokratska republika Kongo, Uganda i Mozambik (sl. 2).<sup>21</sup> U ostatku svijeta koji nema autohtonu pojavnost malarije bilježe se samo uvezeni slučajevi, pa su tako u Republici Hrvatskoj 2021. godine zabilježena svega 3 slučaja.<sup>22</sup>



**Slika 2;** Incidencija malarije u endemskim državama 2021. godine na 100 000 stanovnika.<sup>21,23</sup> Ova karta je izrađena pomoću *mapchart.net* i licencirana je pod *Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License*

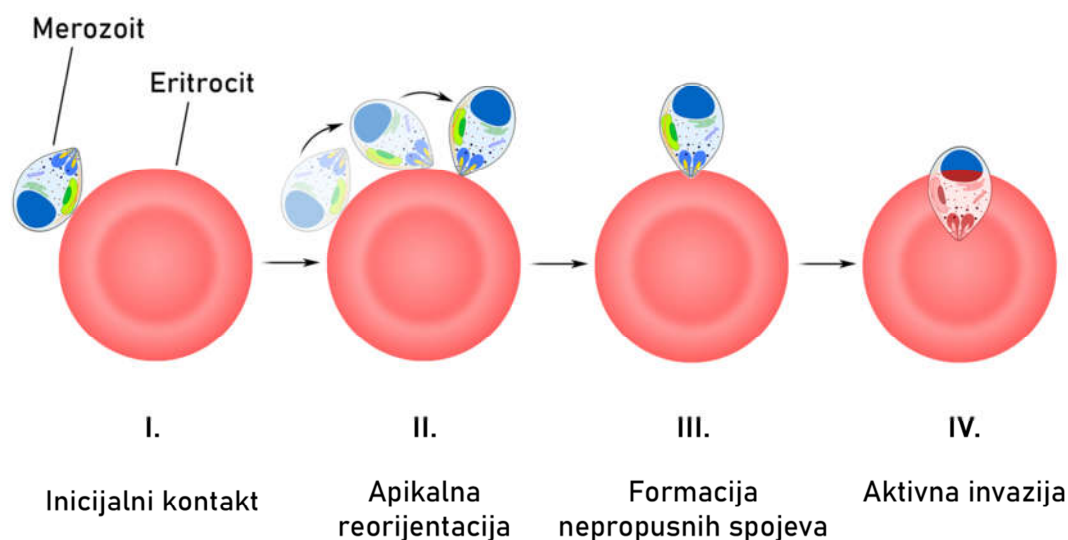
## 2 Biologija plazmodija

### 2.1 Životni ciklus

Složeni životni ciklus plazmodija uključuje spolno i nespolno razmnožavanje, od kojih se spolno odvija u konačnome domaćinu, ženki komarca roda *Anopheles*, a nespolno u prijelaznom domaćinu.<sup>5</sup> (sl. 3)

Prilikom uboda komarca, sporozoiti koji se nalaze u žlijezdama slinovnicama, izlaze u slinu niz rilce (lat. *proboscis*) u tkivo ubodne rane, u slučaju čovjeka - dermis kože. Sporozoiti aktivnim kretanjem unutar nekoliko sati dospijevaju do krvotoka.<sup>24</sup> Za razliku od drugih jednostaničnih organizama koji se kroz medij kreću koristeći specijalizirane organele poput flagela, cilia ili pak sposobnošću mijenjaja oblika stanice uz prisustvo pseudopodija, organizmi skupine Apicomplexa budući da nemaju dotične organele, utiliziraju poseban mehanizam kretanja - ključće gibanje (engl. *gliding motility*). Ono se temelji na interakciji aktina i miozina u pokretačkom aparatu zvanom *glideosom* koji je putem adhezijskih molekula povezan s određenim substratom o kojega se organizam gura. Aktivno kretanje koristi im u migraciji kroz tkiva, invaziji u pojedine stanice domaćina i u nekim okolnostima za izlazak iz stanica.<sup>25</sup> Nakon dospijeća u krvotok, sporozoiti ubrzo ulaze u jetru putem endotelnih i Kupfferovih stanica jetrenih sinusoida.<sup>26</sup> Još se ne zna točan slijed događanja u tome procesu, no poznati su neki od proteina temeljem čijih interakcija sporozoiti prelaze sinusoidalnu barijeru. Oni uključuju SPECT (engl. *sporozoite microneme proteins essential for cell traversal*), SPECT2 - PLP1 (engl. *perforin-like protein 1*) i dr. Protein SPECT2, koji sadrži domenu sličnu kompleksu napada membrane (MAC/PF; engl. *membrane attack complex / perforin-like domain*) i za kojega se pretpostavlja da buši rupe na membrani, omogućuje ulazak sporozoita u stanice. Potom, formiranjem tranzientnih vakuola unutar kojih putuju i prelaze kroz stanicu, izlaze na drugoj strani membrane.<sup>27,28</sup> Ulazak u hepatocyte praćen je vezanjem CSP-a (engl. *circumsporozoite protein*) za visoko sulfonirane proteoglikane (HSPG; engl. *highly sulfated proteoglycans*) jetrenih stanica i ekskrecijom TRAP (engl. *thrombospondin-related anonymous protein*) i AMA-1 (engl. *apical membrane antigen-1*) proteina iz sekretornih apikalnih organela - roptrija (engl. *roptry*) i mikronema (engl. *microneme*).<sup>28,29</sup> U hepatocitu, nakon formacije vakuole u kojoj će se nastaniti, sporozoit poprima ovalno-okrugli oblik te započinje svoje dijeljenje procesom shizogonije. Shizogonija je proces replikacije koji se sastoji od *faze rasta* u kojoj se više puta asinkrono dijele samo jezgre i *faze pupanja* (engl. *budding*) u kojoj se jezgre podijele po posljednji put uz citokinezu i raspodjelu u stanice-kćeri tj. merozoite. Budući da plazmodiji nemaju centrosome u užem smislu riječi, organiziraju svoje diobeno vreteno uz tzv. centriolarne plakove (engl. *centriolar plaque*) koji su usidreni u jezgrinu ovojnici te se neposredno prije kariokineze udvostruče i migriraju na suprotne polove jezgre. Tijekom pupanja, za svakog se merozoita organele apikalnog kompleksa kao i kompleks unutarnje

membrane (IMC; engl. *inner membrane complex*) posebno sastavljaju i stvaraju *de novo*, dok se druge organele dijele iz već postojećih, prolazeći kroz složene morfološke promjene i različite obrasce podjela.<sup>30,31</sup> Multinuklearni stadij u kojemu stanica domaćina sadrži brojne merozoite naziva se shizont. U konačnici, iz jednog će se sporozoita u jetri, u vremenu od tjedan dana stvoriti i do 40 000 merozoita.<sup>31</sup> Po izlasku iz hepatocita, dolazi do formacije vezikula ispunjenih merozoitima, tzv. *merosoma*, koje se odvajaju od hepatocita te šireći se kroz Disseov prostor, ekstracelularni matriks i endotel, završavaju u sinusoidama gdje se merozoiti oslobađaju u cirkulaciju uzrokujući pritom smrt hepatocita. Ovim načinom izlaska, uz inhibiciju ekspresije fosfatidilserina na površini merosoma, merozoiti izbjegavaju fagocitozu od strane Kupfferovih stanica.<sup>32</sup> Slobodni merozoiti u cirkulaciji ulaze u složeni proces invazije eritrocita, koji se sastoji od (sl. 4): inicijalnog kontakta, apikalne reorijentacije, uspostave nepropusnih spojeva (engl. *tight junctions*) i same aktivne invazije uz formaciju parazitarne vakuole.<sup>33,34</sup> Inicijalni kontakt ostvaruje se uz površinski proteinski kompleks merozoita 1 (MSP-1; engl. *merozoite surface protein 1*) koji blago deformira membranu eritrocita, vežući se za proteinski kompleks kojeg čine band 3 i glikoforin A, nakon čega slijede specifične interakcije liganda i receptora s jačim afinitetom, koje dovode do veće deformacije membrane i omogućuju reorijentaciju merozoita, tako da je sa svojim apikalnim krajem u kontaktu s eritrocitom. Pojedini ligandi oslobađaju se iz apikalnih organela (roptrija i mikronema) u nekoliko koraka.<sup>33</sup> U slučaju *P. falciparum* njegovi EBL (engl. *erythrocyte binding-like proteins*) i PfRh (engl. *P. falciparum reticulocyte-binding protein homologs*) ligandi vežu specifične receptore membrane eritrocita poput glikoforina A, B, C, kao i receptor komplementa 1.<sup>28</sup> Za *P. vivax* poznato je da pokazuje veću tendenciju invazije retikulocita (nezrelih crvenih krvnih stanica) u odnosu na zrele eritrocite, zbog prisustva PvRBP (engl. *Plasmodium vivax reticulocyte binding proteins*). Od proteina uključenih u interakciju sa stanicama crvene krvne loze, najviše se ističe važnost liganda PvDBP (engl. *Plasmodium vivax Duffy binding protein*) kojime veže Duffy antigen - (DARC; engl. *Duffy antigen receptor for chemokines*).<sup>35</sup> Isti receptor jednako tako, služi i pri vezanju *P. knowlesi*, dok specifični receptori za *P. malariae* i *P. ovale* nisu poznati.<sup>36</sup> Nakon vezanja specifičnih receptora, u vrste *P. falciparum*, kompleks PfRh5 veže se za *basigin*, dovodeći do navale kalcijevih iona u eritrocitni citosol, i djelujući pritom kao okidač za oslobađanje sadržaja mikronema i roptrija, kompleks proteina RON (engl. *roptry neck protein complex*) implantira se u membranu crvene krvne stanice. Tada se protein AMA1 (engl. *apical membrane antigen 1*) veže za RON, formirajući time nepropusne spojeve koji omogućuju stabilan i visoko afinitetan kontakt eritrocita s apeksom merozoita. Merozoit potom aktivno invadira u crvenu krvnu stanicu, stvarajući tim postupkom parazitarne vakuole u kojoj će se nastaniti.<sup>28,33,34</sup> Po zatvaranju parazitarne vakuole i eritrocitne membrane, uslijed gubitka tekućine, eritrocit privremeno poprima fenotip ehinocita (grč. *echinos*; morski jež) s brojnim bodljikavim izbočinama na membrani.<sup>28,37</sup> Od uspostave inicijalnog kontakta, trajanje invazije iznosi svega 20 sekundi.<sup>33</sup>



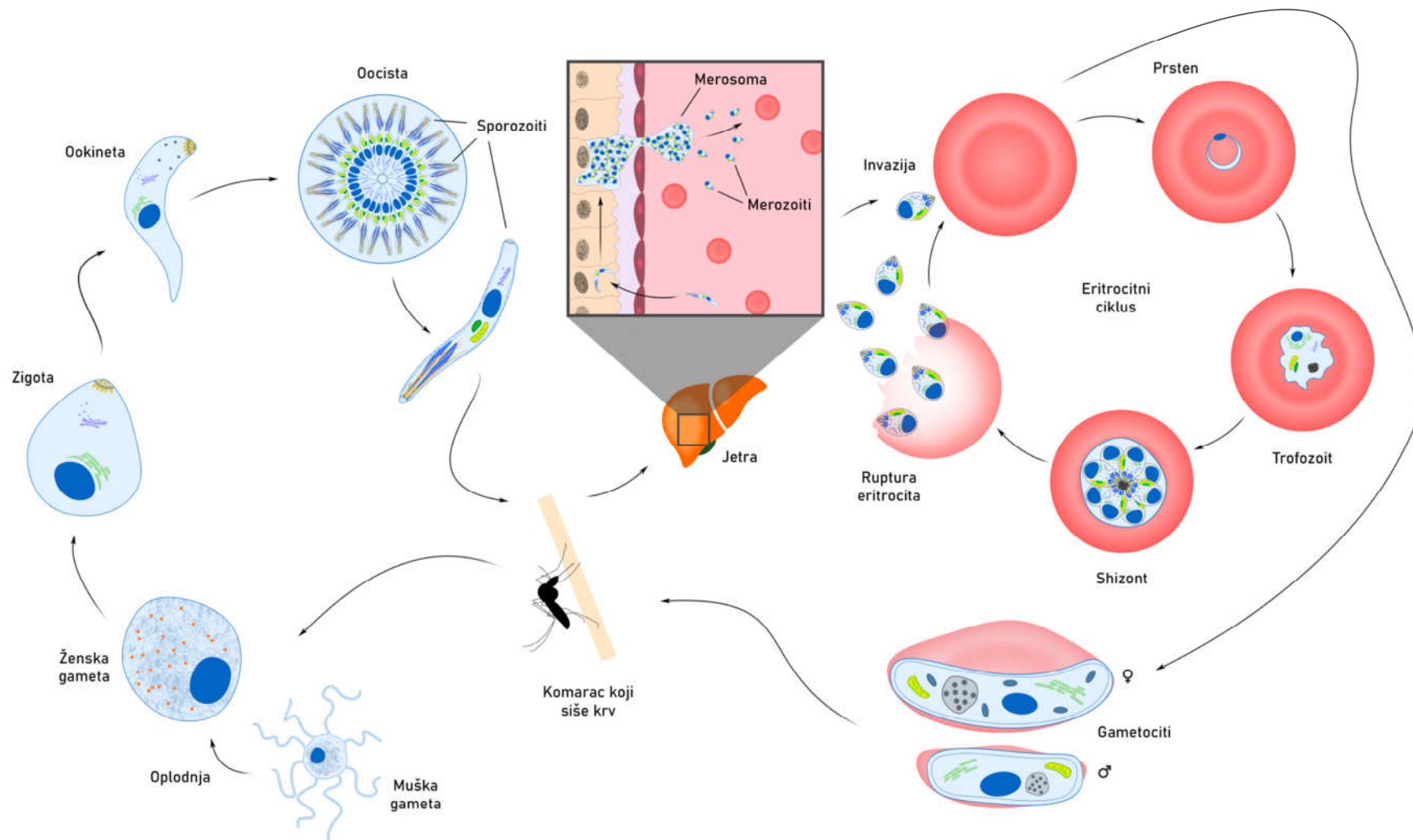
**Slika 4;** Invazija eritrocita - shema

U eritrocitu parazit sazrijeva, prelazeći iz stadija prstena u stadij trofozoita te potom u stadij shizonta.<sup>34</sup> Kako plazmodij prolazi razvojne stadije, njegove se organele mijenjaju i pripremaju za diobu. U stadiju prstena, endoplazmatski retikulum (ER) polumjesečastog je oblika obavijajući jezgru i u njegovoj se blizini nalazi jednostavni Golgijev aparat. Apikoplast je ovalnog oblika, dok je mitohondrij blago izduljen. U stadijima trofozoita ER počinje rasti te širi svoje izdanke po citosolu, okružujući digestivnu vakuolu. U stadijima shizonta mitohondrij i apikoplast pojavljuju se kao opsežno razgranate strukture po cijeloj stanici te će se neposredno prije završetka shizogonije podijeliti i rasporediti u stanice kćeri. Dioba Golgijeva aparata prati diobu jezgre, a jezgre se ponovno dijele obrascem shizogonije.<sup>31</sup> U konačnici tim se nespolnim razmnožavanjem iz jednoga merozoita u eritrocitu, razvije od 6 do 32 novih merozoita, ovisno o vrsti plazmodija o kojemu je riječ.<sup>31,38-40</sup> Novostvoreni merozoiti napuštaju eritrocite, razarajući ih i pri tome dovode do tipičnih malaričnih napadaja koji se pojavljuju svakih 24 (*P. knowlesi*), 36 do 48 (*P. falciparum*), 48 (*P. vivax*, *P. ovale*) ili 72 (*P. malariae*) sata.<sup>5,40,41</sup> Mnogi merozoiti budu uništeni djelovanjem čovjekova imunskog sustava, stoga, kako bi ih se većina domogla sigurnosti koje pruža unutrašnjost eritrocita te započela novi ciklus shizogonije, cijeli proces, počevši od izlaska do ponovnog invadiranja, moraju obaviti unutar tzv. „zlatne minute“.<sup>5,33</sup> Nakon nekoliko sukcesivnih eritrocitnih generacija, plazmodiji mogu započeti gametocitogenezu, odnosno proces diferencijacije u muške mikrogametocite i ženske makrogametocite. Proces samog razvoja gametocita razlikuje se vremenski između pojedinih vrsta plazmodija pa će tako iznositi i do 12 dana u vrste *P. falciparum*, dok će u nekih poput *P. vivax* iznositi svega 48 sati.<sup>42</sup> Opredijeljenost pojedinih merozoita za nastavak aseksualnog razmnožavanja ili diferencijaciju u gametocite određena je prije shizogonije - tj. svi će se merozoiti unutar jednoga shizonta diferencirati u gametocite ili će pak nastaviti u smjeru aseksualnog razmnožavanja.<sup>43</sup>

Jednako će tako merozoiti jednoga shizonta u konačnici postati samo muški ili samo ženski gametociti.<sup>42</sup> Regulacija gametocitogeneze složena je i uključuje genetsku i epigenetsku regulaciju kao i utjecaj okolišnih i metaboličkih čimbenika. Studije su pokazale da delecija *ap2-g* gena dovodi do izostanka u stvaranju gametocita, stoga se smatra da je *ap2-g* gen jedan od ključnih regulatora gametocitogeneze.<sup>42,44,45</sup> Pretpostavka je da ekspresija tog gena održava *bazalnu* gametocitogenezu, dok brojni okolišni čimbenici mijenjajući njegovu ekspresiju, utječu na istu. Visoka parazitemija, potrošeni medij, prisustvo retikulocita kao i antimalarični lijekovi svi pokazuju utjecaj na razinu gametocitogeneze *in vitro*. Isto tako, lizofosfatidilkolin, komponenta ljudskog seruma, može mijenjati produkciju gametocita, odnosno djeluje kao okolišni inhibitor gametocitogeneze indirektno, tj. uzrokujući metaboličke promjene u stanici koje mijenjaju epigenetsku regulaciju.<sup>42,46</sup> Komunikacija među parazitima putem ekstracelularnih vezikula nazvanih „vezikule slične egzozomima“ (engl. *exosome-like vesicles*) pokazala se da doprinosi u facilitaciji seksualne diferencijacije, odnosno svojevrsnoj sinkronizaciji gametocitogeneze. Jedna je pretpostavka da bi u lošijim uvjetima, kao što su prisustvo antimalarika ili pak velika parazitemija (jer domaćin umire), paraziti pribjegavali diferencijaciji prema gametocitima kako bi mogli preživjeti i nastaviti ciklus unutar komarca.<sup>47-49</sup> Unatoč tome, podaci dobiveni *in vitro* istraživanjima ne podudaraju u potpunosti s *in vivo* događanjima, stoga te pretpostavke ostaju nepotvrđene.<sup>48</sup> Na koncu, uz brojna nova saznanja, točan okidač, kao i vrijeme opredjeljenja merozoita za gametocitogenezu i dalje nisu posve razjašnjeni. Po dovršetku diferencijacije gametocita, slijedi prijenos u vektora nakon što komarac posiše krv zaraženog prijelaznog domaćina. U želudcu komarca gametociti sazrijevaju u gamete kao reakcija na promjene u okolišnim uvjetima poput: promjene u pH vrijednosti, pada temperature i izloženosti ksantureničnoj (engl. *xanthurenic*) kiselini.<sup>48</sup> Muški mikrogametociti sazrijevaju procesom tijekom kojega se njihova DNA tri puta uzastopno dijeli, postajući tako oktoploidna. U stanici potom slijedi organizacija osam flagela i dijeljenje, koje se naziva eksflagelacija (engl. *exflagellation*) čime nastaje osam pokretnih haploidnih muških gameta. Muške se gamete tada spoje sa ženskim gametama i time nastaje diploidna zigota. Zigota se razvija u ookinetu koja probija želučani epitel te između epitela i bazalne membrane formira oocistu. Ookineta sazrijeva u periodu do dva tjedna, ovisno o vrsti plazmodija o kojoj je riječ kao i drugim čimbenicima poput okolišne temperature, s formacijom stotina sporozoita koje nakon što rupturira oslobađa u tjelesnu šupljinu komarca (lat. *hemocoel*) ispunjenu hemolimfom. Taj se proces aseksualne replikacije naziva sporogonija. Sporozoiti tada, migriraju kroz hemocoel i dospijevaju do komarčevih žlijezda slinovnica u koje ulaze, prolazeći kroz bazalnu laminu i acinarne stanice. Tada se uglavljaju u uske izvodne kanaliće žlijezda slinovnica spojene s rilcem, putem kojega će biti injicirani u novog domaćina.<sup>5,50,51</sup>

Aseksualni i seksualni oblici plazmodija razlikuju se međusobno morfološki, i svi se mogu vidjeti u krvotoku; no postoji iznimka glede *P. falciparuma* kod kojega se samo stadiji prstena i gametociti vide u perifernoj krvi. Zbog promjena na eritrocitnoj membrani i adhezije na endotelne stanice krvnih žila shizonti ove vrste plazmodija uglavnom se ne vide.<sup>5</sup>

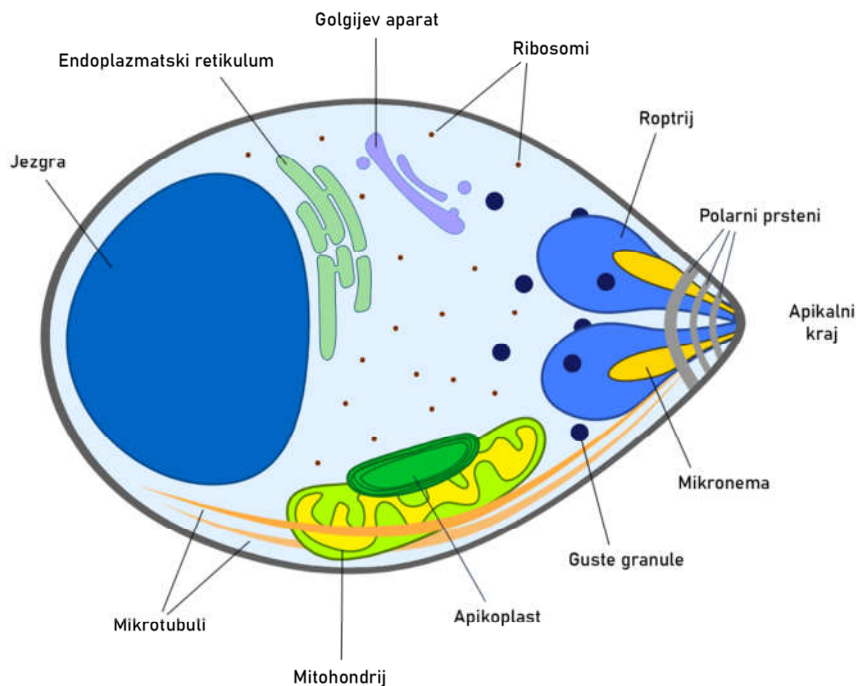




Slika 3; Životni ciklus plazmodija<sup>5,38,51-53</sup>

## 2.2 Stanična građa merozoita

Kako se plazmodij mijenja i prelazi iz jednoga u drugi razvojni stadij tijekom svojeg životnog ciklusa, da bi mogao obitavati u medijima različitih domaćina, odnosno kao prilagodbu na takav način života, stanični oblici pojedinih stadija poprimaju određene fenotipske značajke po kojima se međusobno razlikuju.<sup>28</sup>



**Slika 5;** Stanična građa merozoita

Kao i drugi predstavnici skupine Apicomplexa, invazivni oblici plazmodija karakterizirani su prisustvom tzv. apikalnog kompleksa - skupine strukturnih komponenti i sekretornih organela koji omogućuju invaziju stanica domaćina. Taj kompleks uključuje: roptrije (engl. *rhoptries*), mikroneme (engl. *miconemes*), guste granule (engl. *dense granules*) i polarne prstene (engl. *polar rings*).<sup>54</sup> Te organele pokazuju određene morfološke razlike, uspoređujući ih između sporozoita i merozoita. Roptriji su par organela, specifičnoga oblika po kojemu su i nazvane (grč. *rhopotos*; toljaga, palica). Njihovi se izvodni kanali spajaju prema apikalnoj prominenciji, prolazeći kroz strukture polarnih prstena.<sup>55</sup> Sadrže proteine i lipide koji se oslobađaju u procesu invazije stanica domaćina i sudjeluju započinjući formaciju parazitarne vakuole u kojoj se parazit i nastanjuje.<sup>56</sup> Mikroneme su nitaste strukture, manje i duguljastije od roptrija, a nalaze se na apikalnom kraju okružujući roptrije. Njihov se sadržaj oslobađa prilikom invazije i bitan je za adheziju merozoita na površinu eritrocita.<sup>55</sup> Guste granule se nalaze u blizini vrata roptrija i karakterizirane su njihovim okruglim oblikom i electronski-gustim sadržajem. One se

oslobađaju u parazitarnu vakuolu ubrzo nakon invazije. Pretpostavka je da oslobođeni proteini sudjeluju u organizaciji izvoza proteina i remodeliranja membrane samog eritrocita, poput proteina RESA koji je izvezen u citosol eritrocita unutar 12 minuta poslije početka invazije.<sup>55,57</sup> Polarni prsteni, u slučaju merozoita, odnose se na tri kružne citoskeletne stukture koje se nalaze u regiji stanice povezanoj s drugim apikalnim organelama. Oni dovode to karakterističnog izbočenja stanice - apikalne prominencije. Merozoiti su obavijeni troslojnom membranom koju čine - stanična membrana izvana i dva sloja kompleksa unutarnje membrane (IMC; engl. *inner membrane complex*) iznutra. Kompleks unutarnje membrane povezan je sa parom mikrotubula koji su spojeni s trećim polarnim prstenom.<sup>55,56</sup> Kompleks unutarnje membrane, osim što daje stanici oblik i održava njenu stabilnost djelujući kao svojevrsna skela tijekom formacije stanica kćeri, važan je također i za motilitet te sposobnost invazije jer usidruje pokretački aparat glideosom.<sup>58</sup>

Uz gore navedene specijalizirane organele apikalnog kompleksa, budući da se radi o jednostaničnim eukariotima njihova stanica sadržava i druge organele (i strukture) nužne za razvoj poput jezgre, endoplazmatskog retikuluma, Golgijeva aparata, ribosoma, mitohondrija i apikoplasta.

Apikoplast je plastid nastao sekundarnom endosimbiozom - pojam koji se odnosi na evolucijski proces suživota dvaju organizama u kojemu jedan eukariot, sa svojim već postojećim plastidom dobivenim od cijanobakterije putem primarne endosimbioze, živi unutar drugoga. U ovome slučaju, tj. slučaju pripadnika skupine Apicomplexa, plastidi podrijetla sekundarne endosimbioze, nastali su kada je protist obuhvatio, najvjerojatnije, crvenu algu. Sukladno tome, apikoplast ima četiri membrane - vanjsku (podrijetla stanice protista), središnju (membranu obuhvaćene alge), i unutarnje dvije (membrane kloroplasta).<sup>59</sup> Budući da je endosimbiotskog podrijetla, sadrži svoj vlastiti genom, tako će dakle plazmodiji imati tri različita genoma; nuklearni, mitohondrijski i apikoplastidni. Glede njegove lokalizacije unutar stanice, zanimljivo je da se nalazi u bliskome kontaktu s jednim i jedinim mitohondrijem, njihova je međusobna suradnja krajnje važna budući da su im metabolički putevi međusobno isprepleteni te ovise jedan o drugome.<sup>60</sup> Tijekom aseksualnog razmnožavanja, apikoplast se iz svojeg početnog ovalnog oblika izduljuje, grana i dijeli, tako da sve stanice kćeri tj. merozoiti, imaju po jedan mali apikoplast. S druge strane, tijekom seksualnog razmnožavanja, apikoplast se opet nalazi blizini mitohondrija kao jednostavna ovalna struktura koja, kao i mitohondrij, postoji samo u ženskim gametocitima - maternalno nasljeđivanje organela.<sup>61</sup> Apikoplast ima nekolicinu uloga, sudjeluje u proizvodnji lipida i modifikaciji lipidima-vezanih proteina, što upućuje na bitnu funkciju za ostvarenje interakcije između parazita i stanice domaćina i funkcionalne parazitarnu vakuole. Sintetizira izoprenoide koji se pojavljuju kao prostetičke skupine mnogim enzimima, a uz njih sintetizira i hem. Hem je ključna prostetička skupina mnogih proteina poput citokroma. Budući da se plazmodiji nalaze unutar eritrocita,

hem, koji se oslobađa razgradnjom hemoglobina u njihovoj digestivnoj vakuoli mora se zbog svojeg toksičnog djelovanja neutralizirati - u netoksične kristale hemozina - Stoga, da bi zadovoljio svoje potrebe i bio opskrbljen i u stadijima izvan eritrocita, parazit sintetizira hem *de novo*.<sup>59</sup>

### 2.3 Život u eritrocitu

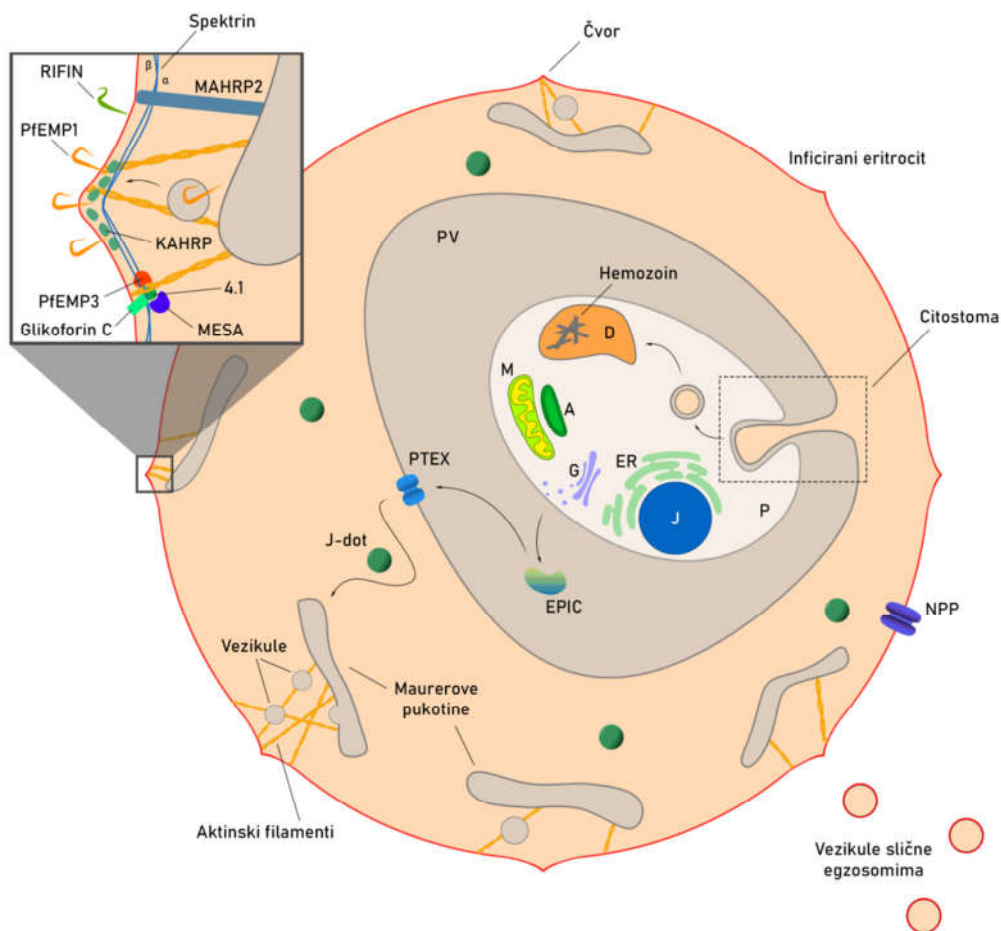
Paraziti se nastanjuju unutar tzv. parazitarne vakuole (PV; engl. *parasitophorous vacuole*) oformljene u eritrocitu (sl. 6). Pretpostavka da parazit jednostavno invaginira dio membrane eritrocita i zatvara se njome u parazitaru vakuolu unutar citosola nije u potpunosti točna, jer se membrana parazitarne vakuole (PVM; engl. *parasitophorous vacuolar membrane*) značajno razlikuje po sastavu proteina i lipida u odnosu na eritrocitnu membranu. Cjelokupni proces samog nastanka nerazjašnjen je, no poznato je da tijekom invazije, sadržaj ispražnjen iz roptrija sudjeluje u formaciji i modifikaciji membrane parazitarne vakuole, koja se još dodatno modificira sadržajem gustih granula, nakon što se parazit nastani u njoj.<sup>56,62</sup> Za tu je membranu pokazano da je u bliskome kontaktu i sa samom staničnom membranom parazita (PPM; engl. *parasite plasma membrane*) i postoje dokazi da su te dvije membrane mjestimično i međusobno povezane, no mehanizmi kojima se facilitira transport proteina, lipida, minerala i hranjivih tvari između membrana nisu u potpunosti poznati.<sup>63</sup>

Iako predstavljaju dobro sklonište od imunskog sustava, eritrociti su nezahvalno stanište za život plazmodija. Naime, kako je eritrocit stanica bez organela, a stoga ne posjeduje mehanizam za sintezu proteina, lipida kao i njihov transport, paraziti su primorani remodelirati stanice domaćina i stvoriti vlastite strukture za navedene procese. Postupak remodeliranja temelji se na izvozu proteina u citosol i njihovoj raspodjeli i organizaciji koja može biti na površini eritrocita ili u proteinskim kompleksima ispod stanične membrane.<sup>64</sup> Proteini koji se izvoze u citoplazmu moraju proći dvije membrane - staničnu membranu parazita i membranu parazitarne vakuole. Nakon translacije i ulaska u endoplazmatski retikulum, većina proteina usmjerenih prema citosolu sadrži signalnu sekvencu duljine pet aminokiselina nazvanu PEXEL (engl. *Plasmodium export element*), koja se potom djelomično cijepa jednom od proteaza, poput enzima *plasmepsin V*.<sup>65,66</sup> Skupina bjelančevina kojima nedostaje PEXEL, tzv. PNEP-ovi (engl. *PEXEL-negative exported proteins*), također se izvoze izvan PVM-a, a za njih se pretpostavlja da sadrže unutarnju hidrofobnu domenu koja im jednako tako služi kao svojevrsan signalni niz.<sup>67</sup> Za prelazak stanične membrane parazita smatra se da se transport odvija putem vezikula,<sup>68</sup> nakon čega bar dio proteina odlazi u intermedijarne komplekse parazitarne vakuole poput EPIC-a (engl. *exported protein-interacting complex*), koji ih potom mogu usmjeriti prema kompleksima za transport na PVM-u kao što je PTEX (engl. *Plasmodium translocon of exported proteins*).<sup>69,70</sup> Kako bi proteini dospjeli do svoga cilja,

paraziti stvaraju posebne organele u eritrocitnom citosolu koje služe kao svojevrsne sortirnice pri usmjeravanju proteina do stanične membrane eritrocita. U slučaju vrste *P. falciparum* te se organele, po svojoj morfologiji slične Golgijevu aparatu, nazivaju Maurerove pukotine (engl. *Maurer's clefts*).<sup>71</sup> Na krvnome razmazu obojenome prema Giemsi, vidljive su kao plave zarezolike točkice na inficiranim eritrocitima. Nalaze se u blizini stanične membrane i usko su povezane s novostvorenim protruzijama nastalih njenim remodeliranjem. Te se protruzije nazivaju čvorovi (engl. *knobs*). Oni nastaju u kasnijim eritrocitnim stadijima razvoja parazita, karakterizirani su prisustvom KHARP-a (engl. *knob-associated histidine-rich protein*) i omogućuju adherenciju za receptore domaćina jer predstavljaju mjesto gdje se, pomoću LyMP-a (engl. *lysine-rich membrane-associated protein*) usidruje PfEMP1 (engl. *Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1*) za citoskelet eritrocita.<sup>34,72,73</sup> U malariji koju uzrokuje *P. falciparum*, PfEMP1 je glavni faktor virulencije, jer vežući se za brojne receptore poput CD36, ICAM1 (engl. *intercellular adhesion molecule 1*), VCAM1 (engl. *vascular cell adhesion molecule 1*), E-selektina, P-selektina, hijaluronske kiseline i dr., omogućuje citoadherenciju, izbjegavanje prolaska kroz slezenu i sekvestraciju eritrocita, te je kao takav glavni uzrok teških kliničkih oblika bolesti poput cerebralne i placentalne malarije. PfEMP1, kodiran je porodicom *var* gena koja mu pruža 60 varijanti proteina s različitim adhezijskim karakteristikama. Zbog svoje izloženosti imunološkom sustavu domaćina, parazit može promijeniti varijantu gena koja se izražava kako bi izbjegao imunološki odgovor, a ta mu sposobnost omogućuje mu da se prilagodi i preživi u okolini koju čini krvotok prijelaznog domaćina.<sup>34,74,75</sup> Osim njega, i brojni su drugi proteini, poput proteina porodica RIFIN i STEVOR, također eksprimirani na površini eritrocita i sudjeluju u patofiziologiji malarije, facilitirajući procese kao što su citoadherencija i formacija rozeta.<sup>76-79</sup> Rozeta je klupko eritrocita nastalo okruživanjem centralno smještenog inficiranog eritrocita neinficiranim eritrocitima, koje može dovesti do vaskularne opstrukcije.<sup>80</sup>

Da bi dosegli svoje ciljno mjesto u eritrocitu ili organele poput Maurerovih pukotina, proteini prelaze citosol (najvjerojatnije) u chaperonskim kompleksima povezanim sa strukturama nazvanima *J-dots*, no i drugi potencijalni mehanizmi, poput vezikularnog transporta i prelaska u obliku solubilnih kompleksa proteina, također su mogući.<sup>65</sup> Glede Maurerovih pukotina, u plazmodija drugih vrsta pronađene su slične strukture, no imaju drugačije nazivlje, pa se tako zovu: Schüffnerove točke (engl. *Schüffner's dots*) u *P. vivax* i *P. ovale*, te Sinton-Mulliganove pukotine (engl. *Sinton-Mulligan's clefts*) u *P. knowlesi*.<sup>71,81</sup> Te su organele povezane sa staničnom membranom putem struktura koje slične lancu (engl. *tether-like structures*). Njihova je glavna komponenta protein MAHRP2 (engl. *membrane associated histidine-rich protein-2*) bez kojega je pokazano da plazmodiji ne mogu preživjeti, što upućuje na važnost tih lančanih struktura kao i s njima povezanih organela.<sup>82</sup> Brojni izvezeni proteini poput RESA (engl. *ring-infected*

*erythrocyte surface antigen*) i MESA (engl. *mature parasite-infected erythrocyte surface antigen*) vežući se za proteine citoskeleta modificiraju mehanička svojstva eritrocitne membrane. RESA, koji je izvezen još početkom invazije eritrocita, veže se za  $\beta$ -spektrin i povećava rigiditet membrane, time sprječavajući denaturaciju proteina i kolaps citoskeleta eritrocita koji bi mogao biti izazvan povišenom tjelesnom temperaturom uslijed malaričnih napadaja, no opet ne previše, kako inficirani eritrociti ne bi bili uklonjeni u slezeni.<sup>73</sup> PfEMP3 (engl. *Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 3*) s druge strane, veže se za alfa lanac spektrina, onemogućujući mu formiranje terciarnog kompleksa s aktinom i proteinom 4.1. Time smanjuje rezistenciju eritrocita na smično naprezanje (engl. *shear stress*), a pretpostavka je da tako omogućuje lakši izlazak zrelih merozoita iz stanice.<sup>83</sup>



**Slika 6;** Shema eritrocita inficiranog s *P. falciparum*. A, apikoplast; D, digestivna vakuola; ER, endoplazmatski retikulum; G, Golgijev aparat; J, jezgra; M, mitohondrij; P, parazit; PV, parazitarne vakuole.

## 2.4 Prehrana

Kao glavni izvor hrane plazmodij koristi hemoglobin. Međutim, budući da on kao molekula ne sadrži izoleucin, a manjkav je i izvor drugih aminokiselina poput metionina, cisteina, glutamina i glutamata, paraziti su prisiljeni pronaći drugi način opskrbe hranjivim tvarima.<sup>84</sup> Iako dio nutrijenata mogu pribaviti putem već postojeće osnovne aktivnosti eritrocitne membrane, taj mehanizam nije dostatan za brzinu rasta njihova organizma, te stoga paraziti povećavaju permeabilnost eritrocitne membrane formacijom tzv. NPP-ova (engl. *new permeability pathways*) kako bi dobili potrebne hranjive tvari. Jedan primjer bio bi anionski kanal PSAC (engl. *plasmodial surface anion channel*) u vrste *P. falciparum*. Zbog povećane propusnosti membrane i velike koncentracije hemoglobina unutar stanice, osmotski tlak raste. Posljedično mogao bi dovesti do preuranjene rupture eritrocita, zato kako bi spriječio neželjeni događaj, plazmodij proždire citoplazmu eritrocita ispunjenu hemoglobinom ne isključivo radi prehrane, već kako bi si osigurao preživljenje i prostor potreban za vlastiti rast.<sup>34,84,85</sup> Plazmodiji svojim rastom mogu zauzeti i do 80% volumena eritrocita, iako najčešće dosegnu veličinu od otprilike 50% volumena. Razgradnja hemoglobina odvija se najvećim dijelom u stadijima trofozoita i shizonta i on se razgrađuje u tzv. digestivnoj (hranidbenoj) vakuoli parazita. To je organela kisele pH vrijednosti (između 5,0 i 5,4) koja se održava protonskim gradijentom stvorenim ATP-aznom pumpom. Za digestivnu vakuolu se pretpostavlja da joj je i jedina funkcija upravo razgradnja hemoglobina.<sup>86</sup> Da bi dospio do nje, hemoglobin treba prijeći membranu parazitarnu vakuole, staničnu membranu parazita i membranu digestivne vakuole. Postoji nekoliko modela koji opisuju tu apsorpciju citosola domaćina, no najprihvaćeniji je model sličan endocitozi, uz tzv. citostomu. Citostoma je struktura koja nastaje invaginacijom PPM-a i PVM-a te posljedičnom formacijom vezikula iz kojih potom nastaje sama digestivna vakuola ili se pak stvorene vezikule stapaju s već postojećom digestivnom vakuolom u starijih parazita.<sup>87</sup> Kao jedan od produkata proteolitičke razgradnje hemoglobina nastaje hem, no kako plazmodiji nemaju enzim hem-oksidadu, a oslobođeni je  $\alpha$ -hematin (feriprotoporfirin IX) toksičan za parazita, kao metodu detoksifikacije konvertiraju monomere hema u inertni biokristal *hemozoin* ili tzv. malarični pigment.<sup>84</sup> Osim citostome postoje i drugi mehanizmi unosa hranjivih tvari, poput novostvorenih transportnih kanala na PVM-u kao što je EXP2, koji omogućuje prolazak molekula manjih od 1,4 kDa.<sup>62</sup>

## 3 Klinička obilježja malarije

### 3.1 Klinička slika

Malarija je karakterizirana nespecifičnim simptomima poput glavobolje, malaksalosti i bolova u mišićima koji su praćeni malaričnim napadajima. Malarični napadaji očituju se tresavicom, zimicom, vrućicom i profuznim znojenjem.<sup>36,88</sup> Napadaji odgovaraju razdobljima rupture eritrocita, koji se ponavljaju svakih 24, 48 ili 72 sata ovisno o vrsti plazmodija o kojemu je riječ. Nastaju zbog oslobađanja pirogena, poput TNF- $\alpha$  (engl. *tumor necrosis factor*) od strane monocita, koji su aktivirani staničnim elementima rupturiranih eritrocita. Populacija predisponirana težim oblicima malarije su djeca, trudnice i imunokompromitirani. U djece malarija dovodi do predispozicije za razvoj bakterijemije, dehidracije, anemije i supresije imunskog sustava.<sup>89</sup>

Od svih vrsta plazmodija, *Plasmodium falciparum* daleko je najčešći uzročnik komplicirane malarije. Zbog prethodno već spomenutog proteina PfEMP1, koji se nalazi na površini eritrocita te dovodi do njihove adhezije za endotel i posljedične sekvestracije u kapilarama, *P. falciparum* izbjegava prolazak kroz slezenu. Inficirani eritrociti se tako nakupljaju u plućima, jetri, mozgu, bubrezima, dermisu kože, crijevima, koštanoj srži i interviloznim prostorima placente, stvarajući time depozite u kojima se nalaze i neinficirani eritrociti, monociti, trombin, fibrinski tračci i trombociti.<sup>89</sup> Komplicirana malarija obilježena je brojnim kliničkim manifestacijama poput: cerebralne malarije, placentalne malarije, acidoze, hipoglikemije, zatajenja bubrega, teške anemije i sindroma respiratornog distresa. Fatalni slučajevi *falciparum* malarije često su praćeni multiorganskim zatajenjem.<sup>88</sup>

Cerebralna malarija je najopasnija moguće fatalna komplikacija malarije. Definira se kao prisustvo periferne aseksualne *P. falciparum* parazitemije i kome (Blantyre skala kome  $\leq 2$  ili Glasgowska skala kome  $\leq 10$ ), bez drugih potencijalnih uzroka poremećaja stanja svijesti.<sup>75,90</sup> Svaki poremećaj svijesti u oboljelih od malarije treba shvatiti ozbiljno. Najčešća manifestacija cerebralne malarije je difuzna simetrična encefalopatija s komom, praćena teškom anemijom, hipoglikemijom, vrućicom, visokom razinom parazitemije i hipoksijom.<sup>36</sup> Etiologija cerebralne malarije nije u potpunosti poznata, no povezana je sa sekvestracijom eritrocita i obstrukcijom na razini kapilara i postkapilarnih venula.<sup>75</sup> Sekvestrirani eritrociti stimuliraju lokalnu proizvodnju i oslobađanje kemokina te upalnih citokina poput TNF- $\alpha$  i IL-1 koji potom dovode do aktivacije endotela i posljedične ekspresije adhezijskih molekula poput P- i E-selektina, ICAM-1, i VCAM-1. Stanice endotela oslobađaju i niz prokoagulantnih faktora kao što su tkivni faktor, faktor aktivacije trombocita (PAF; engl. *platelet-activating factor*) i von Willebrandov faktor (vWF), koji uz prethodno navedene adhezijske molekule, dovode do daljnje



sekvestracije inficiranih i neinficiranih eritrocita, leukocita kao i agregacije trombocita, stvarajući time izvrstan mikrokoliš za intravaskularnu koagulaciju.<sup>89,90</sup> Važna komponenta cerebralne malarije je i oštećenje krvno-moždane barijere. Zbog disrupcije endotela, hemodinamske nestabilnosti, proupalnih citokina kao i prisustva oslobođenog hemozoina (iz rupturiranih inficiranih eritrocita), u stanicama endotela dolazi do aktivacije enzima ciklooksigenaze-2, lipooksigenaze kao i NADPH oksidaze. Ti enzimi, stvarajući kisikove slobodne radikale (ROS; engl. *reactive oxygen species*) poput superoksida ( $O_2^-$ ), vodikova peroksida ( $H_2O_2$ ) i peroksinitrita ( $ONOO^-$ ), oštećuju krvno-moždanu barijeru. U konačnici to rezultira transmigracijom inficiranih eritrocita te stanica imunskog sustava u parenhim mozga i oštećenja aksona te neurodegeneracije.<sup>90</sup> Kao jedan od mogućih uzroka smrti, navodi se edem mozga koji progredira i dovodi do hernijacije praćene disfunkcijom moždanog debla s posljedičnim poremećajem respiracije i pojavom Cheyne-Stokesovog disanja koje u konačnici i prati sam prekid respiracije.<sup>75</sup>

Koma i konvulzije mogu biti posljedica i hipoglikemije. Hipoglikemija je rezultat poremećene glukoneogeneze u jetri te povećane potrošnje glukoze u tkivima. Potrošnja je povećana i uslijed metaboličkih potreba plazmodija. Češće se pojavljuje u djece i praćena je tahikardijom i presinkopom kao i simptomima dispneje, tjeskobe i osjećaja hladnoće.<sup>88</sup> U odrasle populacije povezana je s hiperinzulinemijom koja nastaje zbog stimulacije Langerhansovih otočića određenim faktorima proizvedenim od strane parazita, kao i parenteralnom terapijom kinina ili kinidina.<sup>36,89</sup> Redovito je udružena s metaboličkom acidozom, koja je kao i hipoglikemija znatan je rizični čimbenik smrti u kompliciranoj malariji. Acidemija nastaje zbog nakupljanja organskih kiselina i to predominantno mliječne kiseline - stoga govorimo o laktičnoj acidozi. Mliječna kiselina se nagomilava zbog smanjene dopreme kisika tkivima koja dovodi do povećanog anaerobnog metabolizma. Glavni uzroci tomu su: anemija, sekvestracija eritrocita (koji onemogućuju protok u mikrocirkulaciji), hipovolemija (koja nastaje uslijed gubitka tekućine smanjenim oralnim unosom, povraćanjem i proljevom) i smanjeni klirens laktata (zbog poremećene funkcije jetre i bubrega).<sup>36,88,89</sup> Akutno zatajenje bubrega rezultat je akutne tubularne nekroze čija patogeneza nije posve jasna, no pretpostavka je da joj pridonosi smanjen protok u mikrocirkulaciji. Češće se pojavljuje u odrasloj dobi, dok u djece rijetko.<sup>88</sup>

Placentalna malarija odnosi se na infekciju u trudnoći, tijekom koje se inficirani eritrociti sekvestriraju u interviloznim prostorima placentе. Zanimljivo je kako varijante *PfEMP1* eksprimirane na tim eritrocitima vežu hondroitin-sulfat A (CSA; engl. *chondroitin sulfate A*) sinciciotrofoblasta, a ne uobičajeni CD36 receptor na površini endotelnih stanica.<sup>88</sup> Pretpostavka je da su trudnice, unatoč prethodno stečeno određenoj imunosti preboljevši infekciju CD36-vežućom *PfEMP1* varijantom, podložne placentalnoj infekciji CSA-vežućim *PfEMP1* varijantama.<sup>89</sup> Placentalna malarija povezana je s brojnim komplikacijama poput maternalnog mortaliteta, pobačaja, intrauterine smrti ploda, intrauterinog

zaostajanja u rastu, niskom porođajnom masom, prijevremenog porođaja i povećanog novorođenačkog mortaliteta.<sup>36,89</sup> Kongenitalna malarija pojavljuje se u oko 5% novorođenčadi zaraženih majki.<sup>36</sup>

Anemija (grč. *ἀναιμία*; bez krvi) nastaje kao posljedica destrukcije i fagocitoze inficiranih eritrocita, no za nastanak teške malarične anemije (SMA; engl. *severe malarial anemia*) koja se definira po vrijednosti hemoglobina od <50 g/L u prisustvu visoke razine parazitemije (>10,000 parazita/μL), potrebni su i dodatni čimbenici.<sup>4,75,91</sup> Povećani klirens inficiranih i neinficiranih eritrocita, putem retikuloendotelnog sustava slezene, ključan je u patologiji anemije te se po nekim procjenama smatra da je odgovoran za ≤90% izgubljenih eritrocita.<sup>89</sup> Uz navedeno, smanjena je i eritropoeza, zbog prisustva inflamatornih citokina koji smanjuju sintezu eritropoetina. Stoga, anemija se pojavljuje bez povećanog broja retikulocita i najčešće se opisuje kao normocitna i normokromna.<sup>89</sup> Uz anemiju, trombocitopenija je često prisutna, a u <5% slučajeva komplicirane malarije razvije se i krvarenje uslijed diseminirane intravaskularne koagulacije.<sup>36</sup>

Komplicirani oblici malarije mogu biti uzrokovani i drugim vrstama plazmodija pogotovo u rizičnim populacijama poput djece mlađe od 5 godina i trudnica. Najčešće su to *P. vivax* i *P. knowlesi*, dok su komplicirane infekcije uzrokovane s *P. malariae* i *P. ovale* puno rjeđe.<sup>88</sup> *P. malariae* karakteristično uzrokuje kronične (submikroskopske) infekcije s niskom razinom parazitemije, stoga bolesnici mogu biti inficirani dugi niz godina prije pojave simptoma.<sup>89</sup> Vinetz i sur., opisali su slučaj 74-godišnje žene upravo s infekcijom *P. malariae* koja se prezentirala vrućicom, anemijom i splenomegalijom, no tek između 40 i 70 godina nakon prvotno zadobljene infekcije.<sup>92</sup> Glede *P. vivax*, nedavna su istraživanja pokazala kako i on posjeduje sposobnost sekvestracije eritrocita u kapilarama pojedinih organa.<sup>89,91</sup> Eritrociti inficirani s *P. vivax* mogu se vezati za ICAM-1, hijaluronsku kiselinu i hondroitin-sulfat A. Iako se sekvestracija odvija na manjoj razini u odnosu na *P. falciparum*, jednako tako može završiti fatalno. Najčešća klinička manifestacija *P. vivax* infekcije je anemija, a komplicirani oblici bolesti karakterizirani su i akutnom ozljedom pluća (ALI; engl. *acute lung injury*) ili pak akutnim respiratornim distresnim sindromom (ARDS; engl. *acute respiratory distress syndrome*), kao i rupturom slezene.<sup>91</sup> Patofiziologija kod ove infekcije upravo je povezana sa sekvestracijom eritrocita u plućnim kapilarama.<sup>89</sup>

Budući da se *P. knowlesi* replicira svakih 24 sata, može dovesti do životno-ugrožavajuće hiperparazitemije. Njegove infekcije prezentiraju se širokom spektrom simptoma; Od asimptomatskih do fatalnih infekcija povezanih s hepatorenalnim zatajenjem i sindromom respiratornog distresa. Najčešće manifestacije komplicirane *knowlesi* malarije upravo su ARDS, zatajenje bubrega, žutica i metabolička acidoza. Uspoređujući je s kompliciranom *falciparum* malarijom, najviše se razlikuje po izostanku cerebralne malarije i teške anemije.<sup>14</sup>

### 3.2 Rekrudescencija, recidiv i reinfekcija

Uzrokom ponovne pojave kliničkih simptoma (engl. *recurrence*) malarije, ili pojave parazitemije u perifernoj krvi nakon preboljene bolesti, mogu biti *rekrudescencija*, *recidiv* i *reinfekcija*.<sup>93</sup> U rekrudescencije bolest je suzbijena do razine pri kojoj se ne može detektirati, odnosno do razine pri kojoj se ne očituje simptomima bolesti, no ona postoji još uvijek u tijelu u obliku parazitemije niske razine. Dakle, kod rekrudescencije bolest ponovno uzrokuju već prisutni merozoiti koji se repliciraju u eritrocitima. Plazmodiji mogu dugo vremena živjeti u eritrocitima i održavati nisku parazitemiju ne uzrokujući pri tome imunosni odgovor. Takvo stanje (rekrudescencija) nastaje najčešće zbog neadekvatne terapije ili rezistencije plazmodija na određene antimalarike. S druge strane, pojam recidiv (engl. *relapse*) rezerviran je samo za ponovno oboljenje, nakon potpunog oporavka od prethodne bolesti, putem shizogonije u jetri, odnosno aktivacijom hipnozoita.<sup>94</sup> Recidiv bolesti uzrokovan je dakle dormantnim oblikom parazita - hipnozoitom. Hipnozoiti perzistiraju u hepatocitima dugo nakon prolaska kliničkih simptoma i iako je sama priroda hipnozoita slabo znana, poznato je da oni nastaju isključivo diferencijacijom iz sporozoita,<sup>41,94</sup> i tek je nedavno po prvi puta promatrana *in vitro* formacija shizonta od individualno aktiviranih hipnozoita.<sup>95</sup> Od uzročnika humane malarije, samo se za *P. vivax* i *P. ovale* vjeruje da imaju sposobnost razvijanja hipnozoita, a uslijed nedovoljnih dokaza dovodi se i u pitanje postojanje hipnozoita u *P. ovale* malarije.<sup>41,96</sup> Osim njih, od uzročnika malarije u drugih primata, *P. cynomolgi* i *P. simiovale* također pokazuju tu sposobnost. Reinfekcija se odnosi na ponovnu infekciju posve drugim plazmodijem, odnosno ponovnim ubodom nekog komarca.<sup>97,98</sup>

## 4 Laboratorijska dijagnostika malarije

Malarija je uglavnom izlječiva bolest, ako se prethodno pravodobno dijagnosticira. Kako bi se uopće posumnjalo na nju, potrebno je uzeti dobru epidemiološku anamnezu i povezati ju s kliničkom slikom. Kliničku dijagnozu nije moguće jednostavno postaviti, zbog sličnosti simptoma malarije s drugim bolestima.<sup>5</sup> Stoga, da bi oboljelima bila pružena ispravna terapija i da se izbjegne mogući fatalni ishod, nužno je prepoznati uzročnika. Taj je posao prepušten rukama dijagnostičara i različitim laboratorijskim tehnikama. U idućim odlomcima navedene su metode koje se koriste rutinski i metode koje se tek razvijaju u dijagnostici malarije.

### 4.1 Svjetlosna mikroskopija

I dalje, nakon 140 godina od otkrića plazmodija, zlatni standard dijagnostike malarije ostaje svjetlosna mikroskopija uzoraka krvi bolesnika. Ubodom lancete u jagodicu prsta uzorkuje se krv i prenosi na predmetno stakalce. Od uzorka krvi priprema se razmaz krvi (engl. *thin smear*) i gusta kap (engl. *thick smear*). Nakon toga uzorci se boje najčešće u našem području bojanjem metodom po Giemsi.<sup>40</sup> Bojenje po Giemsi, nazvano prema njemačkom bakteriologu Gustavu Giemsi, obavlja se otopinom koja se sastoji od metilenskog modrila, eozina i komponente nazvane *azure B* (trimetiljonin) te predstavlja standardno bojanje u detekciji i identifikaciji plazmodija, čija će citoplazma biti obojana u plavo, a kromatinska tvar u crveno. Uz navedenu metodu bojanja postoje i druge metode npr. prema Wrightu ili Leishmanu.<sup>99</sup> Krv se može uzeti i venepunkcijom, no u tom slučaju, kako se krv ne bi zgrušala za vrijeme njenog transporta do laboratorija, potrebno je korištenje nekog antikoagulansa. Etildiamintetraoctena kiselina (EDTA; engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*) je antikoagulans izbora, jer za razliku od drugih, poput heparina, u kraćem vremenskom roku neće dovesti do značajnog izobličenja u izgledu parazita. Krvni razmazi trebali bi se pripremiti unutar sat vremena od primitka krvi, a kako jedan preparat može biti nedovoljan za detekciju plazmodija, CLSI (engl. *clinical and laboratory standards institute*) smjernice preporučuju pripremu 2 razmaza krvi i 2 guste kapi po početnoj evaluaciji pacijenta, s ponovnom pripremom i pregledom uzoraka svakih 6 do 8 sati tijekom tri dana, prije nego što bi se malarija smjela isključiti iz diferencijalne dijagnoze.<sup>38</sup> Slično tome, CDC (engl. *centers for disease control and prevention*) preporuča da se krvni razmaz u neimunih osoba pregledava svakih 8 do 12 sata tijekom 3 dana prije nego što se malarija može isključiti.<sup>100</sup> Uzorci krvi naravno, moraju biti prikupljeni prije upotrebe bilo kakvih antimalarika. Točno vrijeme uzimanja uzoraka također je bitno. Kako je najveći broj parazita vidljivih u eritrocitima prisutan u razdobljima između malaričnih napadaja, upravo su ta razdoblja optimalan trenutak za uzimanje uzorka periferne krvi. Ako se krv uzorkuje tijekom malaričnih napadaja s druge strane, koji nastaju kao posljedica pucanja eritrocita i njihovog oslobađanja merozoita, mikroskopičar bi

mogao imati poteškoća s identifikacijom pojedine vrste plazmodija.<sup>40</sup> Unatoč tome, zbog nepredvidivosti tijeka kliničke slike bolesnika, koja se može pogoršati u kratkom vremenskom roku te dovesti do životno ugrožavajućeg stanja, po sumnji na malariju, uzimanje uzorka krvi trebalo bi se obaviti bez odgode. U slučaju da laboratorij nema iskustva u pregledu razmaza krvi, u obzir dolaze i brzi antigenski testovi ili pak hitan transport u susjedni laboratorij koji može primiti krv i obaviti mikroskopski pregled.<sup>38</sup>

Za izradu guste kapi potrebno je uzeti oko 5 mikrolitara krvi što je najjednostavnije korištenjem kalibrirane pipete. Krv se nakon stavljanja na stakalce razmaže drugim predmetnim stakalcem u mrlju promjera oko 1,5 centimetra. Ono se mora dobro osušiti da bi se pristupilo bojenju. Budući da tijekom pripreme preparat nije fiksiran, zbog hipotonične naravi Giemsi otopine, nastupa ruptura eritrocita i oslobađanje njihova sadržaja. Pri mikroskopiji guste kapi uočavaju se paraziti, tamno plave jezgre leukocita i raštrkani trombociti na pozadini koju čine lizirane crvene krvne stanice. Gusta kap je 10 do 20 puta osjetljivija od razmaza krvi te se stoga i prva treba pripremiti i pregledati. Njome se potvrđuje prisustvo plazmodija i određuje razina parazitemije, dok se krvnim razmazom razlučuje o kojoj je vrsti plazmodija riječ. Kvalitetno pripremljen preparat guste kapi trebao bi biti širine između 1,5 do 2 cm u promjeru i debljine takve ispod koje je moguće čitanje teksta novinskog papira.<sup>38</sup> Za krvni razmaz potrebno je 1-3 mikrolitara krvi koja se razmaže u tankome sloju na predmetnome stakalcu. Zatim, tijekom jedne do dvije minute slijedi fiksacija metanolom, koja je ključan korak u cijelome postupku jer se njome čuva morfologija eritrocita i parazita, što kasnije omogućuje i identifikaciju vrste plazmodija. Nakon fiksacije, preparat se suši i potom boja po Giemsi, za čiju se otopinu preporuča pH vrijednost između 7,0 i 7,2 kako bi se najbolje uočile specifične citoplazmatske inkluzije ili neke druge značajke parazita. Razmaz krvi karakteriziraju blijedi, sivkasto plavi ili ružičasti eritrociti s očuvanom staničnom membranom, unutar koje se nalaze paraziti s plavom citoplazmom i crvenkasto ljubičastim kromatinom. Pri pregledu razmaza, preporuča se odabir područja s minimalnim preklapanjem eritrocita u kojemu eritrociti imaju održanu centralnu bljedoću, jer izvan ovog područja morfologija parazita zna biti promijenjena. Određivanje pojedine vrste plazmodija moguće je zbog brojnih morfoloških razlika poput veličine i oblika inficiranog eritrocita, prisustva karakterističnih citoplazmatskih inkluzija kao i razlika u morfologiji pojedinih životnih stadija među različitim vrstama plazmodija (tabl. 1).<sup>5,38,40</sup> Glede veličine eritrocita, u vrsta *P. vivax* i *P. ovale* inficirani eritrociti imaju povećan promjer, dok u infekcijama ostalim vrstama plazmodijima njihov promjer ostaje nepromijenjen. Oblik je jednako važno svojstvo, npr. ovalni oblik eritrocita, koji se opisuje i kao oblik kometa, upućuje prema istoimenome *P. ovale*, dok su gametociti nalik na bananu, odnosno srpolikog oblika (lat. *falx*; srp) tipična odrednica infekcije *P. falciparum*. Uz njih, prisustvo citoplazmatskih inkluzija, koje mogu biti vidljive u određenim uvjetima, dijagnostičaru također mogu pomoći u definiranju vrste; *P. vivax* i *P. ovale* pokazuju prisustvo

Schüffnerovih, odnosno Jamesovih granula, *P. falciparum* zarezolikih Maurerovih pukotina, *P. malariae* Ziemannove (engl. *Ziemann's stippling*), a *P. knowlesi* tzv. Sinton-Mulliganove granulacije (engl. *Sinton and Mulligan's stippling*).<sup>40</sup> U konačnici, pregledom razmaza krvi možda se i neće uočiti niti jedno karakteristično svojstvo pa će se tek zajedno s kliničkom slikom i obrascem nastupa malaričnih napadaja tipičnih za neku vrstu moći odrediti najvjerojatniji uzročnik, ili uzročnici, budući da je infekcija s više vrsta plazmodija istovremeno također moguća.<sup>101</sup>

Kada se odredi vrsta plazmodija, bitno je kod vrsta *P. falciparum* i *P. knowlesi* odrediti stupanj parazitemije kako bi se odredila inicijalna terapija, prognoza bolesti i monitorirala reakcija na terapiju. To se može učiniti koristeći gustu kap ili krvni razmaz. U procjeni parazitemije pregledom guste kapi uobičajeno je simultano brojanje leukocita i plazmodija u nekoliko vidnih polja. Brojanje prestaje najčešće nakon pregledanih 200 leukocita, nakon čega slijedi izračun gustoće parazita putem neke od formula. Ako se za pacijenta ne zna točan broj leukocita, uzima se procijenjeni prosječni broj od 8000 leukocita po  $\mu\text{L}$  krvi.<sup>38,102,103</sup>

$$\text{Plazmodiji}$$

$$\mu\text{L krvi} = \frac{\text{Broj plazmodija prebrojen} \times \frac{8000 \text{ leukocita}}{\mu\text{L}}}{\text{Broj prebrojenih leukocita}}$$

U procjeni parazitemije pregledom krvnog razmaza najčešće se broje inficirani eritrociti u 20 vidnih polja te se opet dobiveni podatci uvrštavaju u formulu. Ako je ukupan broj eritrocita nepoznat, uzima se vrijednost od 5000000 eritrocita po  $\mu\text{L}$  krvi. Pri brojanju eritrocita, bitno je ne uključiti gametocite u izračun jer oni nisu infektivni za čovjeka i ne ubijaju se antimalaricima.<sup>38,100,103</sup>

$$\text{Plazmodiji}$$

$$\mu\text{L krvi} = \frac{\text{Broj inficiranih eritrocita} \times 5000000 \text{ eritrocita}/\mu\text{L}}{\text{Broj prebrojenih eritrocita}}$$

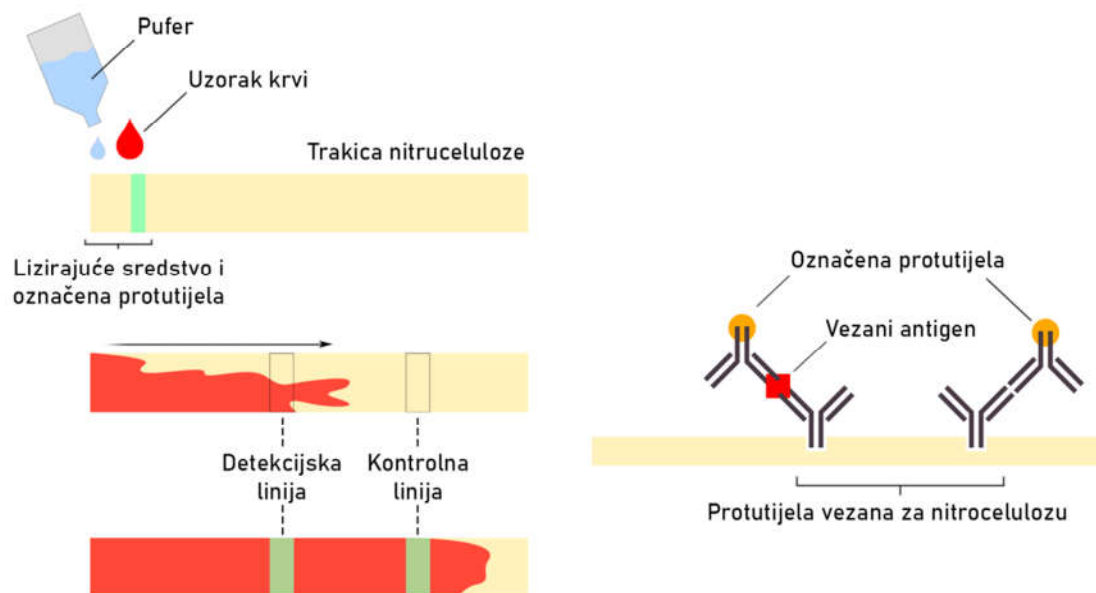
Unatoč činjenici da je mikroskopija zlatni standard, kao i svaka metoda i ona ima svoje nedostatke. Mikroskopijom je teško moguće odrediti infekcije s niskim razinama parazitemije, budući da detekcijska granica za nju u idealnim uvjetima može iznositi između 4 i 20 parazita po  $\mu\text{L}$  krvi, a u lošijim i preko 100 parazita po  $\mu\text{L}$  krvi.<sup>38,104</sup> Gusta kap pokazuje 10 do 20 puta veću osjetljivost u odnosu na krvni razmaz, te se stoga razmaz krvi najviše koristi za identifikaciju vrste i određivanje parazitemije. Pravilna interpretacija mikroskopije ovisi o dostupnosti kvalitetnih reagensa, dobro održavanih svjetlosnih mikroskopa, ali i o raspoloživosti treniranih mikroskopičara zbog iskustva koje je potrebno za precizno razlikovanje parazita od trombocita, staničnog debrisa i leukocitnih granula na gustoj kapi.<sup>104</sup> Dok se ne razvije metoda praktičnija i financijski isplativija od mikroskopije, dijagnoza kao i liječenje oboljelih, ovisit će najviše o upravo preciznosti mikroskopičara.

**Tablica 1;** Morfološke razlike pojedinih vrsta plazmodija u razmazu krvi obojanom po Giemsi.<sup>5,38,40,101</sup>

	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. falciparum</i>	<i>P. knowlesi</i>
Veličina i oblik inficiranih eritrocita	Eritrociti su uvećani za 1,5 do 2 puta, no mogu biti i normalne veličine; normalnog ili ovalnog oblika	60% eritrocita je uvećano i ovalnog oblika; 20% eritrocita ima nepravilne rubove	Eritrociti su normalnog oblika; mogu biti normalne veličine ili blago umanjeni	Eritrociti su normalne veličine i oblika	Eritrociti su normalne veličine i oblika
Citoplazmatske inkluzije	Schüffnerove točke; ne moraju biti prisutne u stadiju prstena	Schüffnerove ili Jamesove točke; točke su tamnije i veće u odnosu na <i>P. vivax</i> ; ne moraju biti prisutne u stadiju prstena	Ziemannove točke; zahtijevaju prekomjerno bojanje Giemsom	Maurerove pukotine - crvene zarezolike inkluzije	Sinton-Mulliganova istočkanost
Stadij prstena	Prsteni $\geq$ 1/3 promjera eritrocita; citoplazma zaokružuje vakuolu; veće kromatinske točkice u odnosu na <i>P. falciparum</i>	Prsteni $\geq$ 1/3 promjera eritrocita; slične na <i>P. vivax</i>	Prsteni zauzimaju 1/8 eritrocita; točkice kromatina mogu se činiti odvojene u sredini prstena (oblik „ptičjeg oka“)	Delikatni prsteni, <1/3 promjera eritrocita, često s duplim točkicama kromatina; ponekad na rubu stanice („appliqué“ oblik)	Prsteni $\leq$ 1/3 promjera eritrocita; dvostruke kromatinske točkice, rijetko kada u appliqué obliku; podsjeća na <i>P. falciparum</i>
Stadij trofozoita	Ameboidni trofozoiti, zlatno-smeđeg pigmenta	Kompaktniji i manje ameboidni u odnosu na <i>P. vivax</i> , tamno smeđi pigment	Kompaktna citoplazma; okruglog, ovalnog, ili oblika vrpce; tamno smeđi pigment	Ne vide se u perifernoj krvi; debeli kompaktni prsteni	Blago ameboidni; oblici vrpce su česti; raštrkane nakupine zlatno smeđeg pigmenta; podsjeća na <i>P. malariae</i>
Stadij shizonta	12-24 merozoita, svaki s kromatinom i citoplazmom	6-14 merozoita (8-12) u rozetama ili nepravilnim nakupinama	6-12 merozoita; često su radialno složeni oko centralnog smeđe - zelenkastog pigmenta (oblik rozete)	Ne vide se uobičajeno u perifernoj krvi; 8-32 merozoita	10-16 merozoita
Gametociti	Okrugli do ovalni; homogena citoplazma; difuzno prisutne blage smeđe pigmentacije popunjuju većinu eritrocita	Okrugli do ovalni; manji u odnosu na <i>P. vivax</i> ; popunjuju većinu eritrocitne citoplazme	Okrugli do ovalni; slične na <i>P. vivax</i> s tamnijim i grubljim pigmentacijama	Oblik srpa ili banane; mijenjaju oblik eritrocita	Okrugli do ovalni; popunjuju većinu eritrocitne citoplazme

## 4.2 Brzi dijagnostički (antigeni) testovi

Brzi dijagnostički testovi (RDTs; engl. *rapid diagnostic tests*) predstavljaju laboratorijsku metodu temeljenu na imunokromatografiji, kojom se u kratkom vremenskom razdoblju detektira prisustvo solubilnih malaričnih antigena u uzorku krvi (sl. 7).<sup>5</sup> Njihova je korist od velikog značaja na prostorima gdje mikroskopija i druge dijagnostičke metode nisu lako izvedive.<sup>105</sup> Njihovom dostupnošću izbjegava se empirijsko liječenje prije samog potvrđivanja bolesti, a budući da je izvedba tih testova jednostavna, mogu se pružiti i putnicima koji odlaze u endemske zemlje za njihovu samostalnu dijagnostiku.<sup>106</sup> Osim toga, imaju svoju funkciju i u ne-endemskim zemljama gdje malarija postoji samo kao importirana bolest, jer osoblje u nekim centrima koje rijetko kada vidi malariju nije uvježbano u mikroskopskoj dijagnostici iste, te stoga brzi dijagnostički testovi predstavljaju jednostavnije rješenje.<sup>107</sup>



**Slika 7;** Princip rada brzih antigenih testova - osnova ovih dijagnostičkih testova temelji se na imunokromatografskoj detekciji antigena. Uzorak krvi se nanese na jedan rub nitrocelulozne trakice te se pomiješa s puferskom otopinom, lizirajućim sredstvom i označenim anti-plazmodijalnim protutijelima. Tada ta smjesa migrira po trakici gdje će stupiti u kontakt s hvatačkim protutijelima koja su vezana na površini nitroceluloze. Ta hvatačka protutijela specifična su za pojedine epitope parazitnih antigena ili za označena anti-plazmodijalna protutijela. Nakon formacije kompleksa između protutijela pojaviti će se vidljive linije na trakici. Rezultati se najčešće očitavaju unutar 15 minuta.<sup>108-110</sup>



Antigeni koji se koriste za detekciju su sljedeći: Plazmodijski histidinom-bogati protein 2 (*pHRP2*; engl. *Plasmodium histidine-rich protein 2*), plazmodijska laktat dehidrogenaza (*pLDH*; engl. *Plasmodium lactate dehydrogenase*) i plazmodijska aldolaza (*pALDO*; engl. *Plasmodium aldolase*).<sup>5,38,105</sup> *P. falciparum* jedini proizvodi histidinom-bogati protein 2, stoga je on specifičan isključivo za tu vrstu plazmodija.<sup>107</sup> Brzi testovi koji detektiraju taj antigen, specifični su i pokazuju visoku osjetljivost te su česti izbor u Africi gdje veliku većinu slučajeva upravo uzrokuje *P. falciparum*.<sup>21,105</sup> Plazmodijska laktat dehidrogenaza, glikolitički je enzim koji može biti specifičan za *P. falciparum*, *P. vivax* ili pak može postojati kao varijanta prisutna u svim vrstama, tj. može biti panspecifična za rod *Plasmodium*.<sup>108</sup> Plazmodijska aldolaza je također glikolitički enzim, a prisutna je u svim vrstama plazmodija. Testovi temeljeni na aldolazi pokazuju manju osjetljivost za *P. falciparum* u odnosu na *pHRP2*. Osjetljivost tih testova, usporediva je s testovima temeljenim na detekciji *pLDH*,<sup>105</sup> no neke studije pokazale su kako je test nepouzdan u detekciji *P. vivax*, s osjetljivošću od svega 62%.<sup>111</sup> S druge strane neke vrste testova temeljenih na detekciji *pLDH* pokazuju bolju osjetljivost i specifičnost u detekciji *P. vivax*. Prema *Cochrane* istraživanju iz 2020., *CareStart Malaria Pf/Pv Combo test* pokazao je visoku osjetljivost (99%) i specifičnost (99%) u detekciji *P. vivax*, dok je *Falcivax Device Rapid test* imao nešto nižu osjetljivost (77%) s visokom specifičnošću (99%), što znači da će točno identificirati negativne slučajeve, s mogućnošću postojanja određenog broja lažno negativnih.<sup>112</sup>

Različitim kombinacijama antigena koji se detektiraju, proizvode se različiti dijagnostički testovi. Tako postoje testovi specifični za pojedine vrste poput *P. falciparum* ili *P. vivax*, koji mogu biti udruženi s detekcijom panspecifičnih antigena. Trenutno ne postoje specifični testovi za dijagnostiku *P. ovale*, *P. malariae* i *P. knowlesi*. Postoji potreba za dijagnostičkim testom specifičnim za *P. knowlesi*, budući da ga testovi koji detektiraju *pLDH* ne mogu identificirati u mješovitim infekcijama s *P. vivax* i *P. falciparum*.<sup>107,108</sup>

Unatoč koristima koje pružaju, brzi dijagnostički testovi imaju brojne manjkavosti i ne mogu zamijeniti mikroskopiju u potpunosti, jer se njima ne mogu razlikovati seksualni od aseksualnih oblika plazmodija niti se može procijeniti razina parazitemije, a i osjetljivost im se smanjuje pri niskim razinama iste (<100 parazita/ $\mu$ L).<sup>107</sup> Jednako tako, budući da se gametociti ne eliminiraju standardnom antimalarijskom terapijom, a nastavljaju stvarati aldolazu i *pLDH*, brzi dijagnostički testovi ne mogu se koristiti u monitoriranju odgovora na terapiju.<sup>108</sup> Uz navedeno, u određenim dijelovima svijeta primijećena je delecija gena za *pHRP-2*, što utječe na osjetljivost testova specifičnih za *P. falciparum*, temeljenih upravo na detekciji *pHRP2*. Iako se detekcija primarno odnosi na *pHRP2*, protein *pHRP3* zna križno reagirati s *pHRP2* i dovesti do pozitivnog rezultata u plazmodija unatoč prisutne delecije *pHRP2* gena.<sup>105,108</sup> U razdoblju od 2021. do 2022., u 17 su zemalja zabilježeni sojevi s delecijom oba gena.<sup>21</sup> U detekciji

*pHRP2* zabilježeni su i lažno pozitivni rezultati uslijed križnih reakcija u osoba koje imaju pozitivan reumatoidni faktor u sklopu sistemskih autoimunskih bolesti, kao i u osoba s akutnom shistosomijazom uzrokovanom vrstom *Schistosoma mekongi*.<sup>113</sup> Zbog navedenog, nužan je novi marker za detekciju. Plazmodijska glutamat dehidrogenaza (*pGDH*; engl. *Plasmodium glutamate dehydrogenase*) novi je potencijalni kandidat kao antigen za brzu dijagnostiku malarije. To je protein koji se proizvodi tijekom cijele shizogonije i postoji isključivo u inficiranim eritrocitima; opisan je prvi puta još 1975. godine.<sup>114,115</sup> Pokazana je njegova uspješna detekcija u vrste *P. falciparum*, no zbog moguće križne reaktivnosti s drugim vrstama, kao i nedostatnih podataka o njegovoj upotrebljivosti, potrebno je još istraživanja kojima će se odrediti je li moguće koristiti testove temeljene na *pGDH*-u u dijagnostici malarije.<sup>115</sup>

### 4.3 Serološka dijagnostika

Serologija obuhvaća postupke kojima se detektiraju protutijela protiv plazmodija, stoga uključuje metode poput neizravnog imunoenzimskog postupka (ELISA; engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) i indirektnu imunofluorescenciju (IFAT; engl. *indirect fluorescence antibody test*).<sup>116</sup> Zlatni standard u serološkom testiranju upravo je indirektni imunofluorescentni test.<sup>117</sup> Tijekom tog postupka pripremljeni uzorak s antigenom čuva se na stakalcu pri temperaturi nižoj od -30°C sve do uporabe, kada se tijekom iste na stakalce aplicira serum bolesnika i anti-humana protutijela označena fluorescentnom bojom. Tada se preparat promatra pod fluorescentnim mikroskopom.<sup>117,118</sup> Serološka testiranja pokazuju visoku osjetljivost i specifičnost, no za njihovu izvedbu potrebno je vrijeme, oprema i uvježbani mikroskopičar, a zbog vremena potrebnog za razvoj protutijela serologija nema značajnu ulogu u rutinskoj dijagnostici akutne malarije. Međutim, mogu biti korištena u probiru organa za presadbu kao i za serološki probir darivatelja krvi. Isto tako mogu biti korištena u razjašnjavanju etiologije bolesti pacijenata koji su se nedavno liječili protiv malarije, ali kod kojih je sama dijagnoza malarije bila upitna - odnosno za retrospektivnu dijagnozu. I naposljetku, u endemskim područjima serologija predstavlja neprocjenjivu metodu za epidemiološka istraživanja.<sup>38,101</sup>

#### 4.4 Dijagnostika temeljena na hemozoinu

Hemozoin ili tzv. malarični pigment, je inertni biokristal nastao tijekom razgradnje hemoglobina.<sup>84</sup> Budući da se sekvestrirani eritrociti nakupljaju u kapilarama organa (jetre, bubrega, pluća, placente i mozga) hemozoin, koncentriran u eritrocitima ili makrofagima, se tako može uočiti na histološkim preparatima tkiva kao smeđa unutarstanična pigmentacija.<sup>38</sup> Metodom mikroskopije u tamnom polju moguće je razlikovanje hemozoina od drugih objekata s visokom osjetljivošću (95%) i specifičnošću (97%), no samo u stadijima plazmodija koji sadrže detektabilne razine istog. U stadijima prstena mlađima od šest sati, nije ga moguće detektirati.<sup>119</sup> Hemozoin je prisutan u svim vrstama plazmodija i njegova je količina proporcionalna težini bolesti tj. razini parazitemije, a kako se radi o kristalu, za razliku od enzima korištenih u brzim antigenskim testovima, nije podložan genetskim modifikacijama, te stoga predstavlja stabilnu molekulu koja može poslužiti kao važan biomarker.<sup>120</sup> Hemozoin upravo i posjeduje određena biofizikalna svojstva koja se mogu iskoristiti u dijagnostici ili istraživačkome radu a to su: paramagnetizam, optički dvolom i fotoakustičnost.<sup>84</sup> U te svrhe, razvijaju se brojni biosenzori, tj. uređaji koji putem bioreceptora prepoznaju ciljnu molekulu i promjene u njenim svojstvima (optičkim, magnetskim, elektrokemijskim, piezoelektričnim) i te neelektrične biološke vrijednosti pretvaraju u električne signale.<sup>121</sup>

Optički biosenzori prepoznaju promjene u svjetlosti prilikom interakcije između ciljne molekule i bioreceptora. Jedan tip takvih biosenzora su fluorescencijski senzori. Oni se temelje na emitiranju fluorescentnog svjetla fluorofora pri određenoj valnoj duljini nakon apsorpcije zračenja druge energetske vrijednosti (tj. druge valne duljine). Intenzitet fluorescencije je proporcionalan koncentraciji analita.<sup>120,122</sup> Moguća je primjena i metoda temeljenih na rezonanciji površinskih plazmona (SPR; engl. *surface plasma resonance*). SPR biosenzori mjere promjene loma, kuta i intenziteta refleksije materijala rezonancije, uzrokovane interakcijom između bioreceptora i ciljne molekule, što upravo omogućuje detekciju ciljne molekule u stvarnom vremenu.<sup>120</sup>

Metoda temeljena na Ramanovoj spektroskopiji nazvana SERS (SERS; engl. *surface-enhanced Raman spectroscopy*) koristi se u detekciji hemozoina. Ramanova spektroskopija je tehnika ispitivanja energetske stanja molekula u otopinama i energije veza u kristalima.<sup>123</sup> Njome se bilježi intenzitet, frekvencija kao i valna polarizacija emitiranog nekoherentnog raspršenog zračenja neke molekule, po njenoj interakciji sa snopom vidljive monokromatske svjetlosti, tj. temelji se na Ramanovu efektu.<sup>123,124</sup> Budući da se hemozoin najvećom mjerom stvara u stadijima trofozoita i shizonta, potrebna je tehnika kojom bi se pojačali Ramanovi signali za stadije prstena kako bi se osigurala osjetljivost metode potrebna za ispravnu dijagnozu.<sup>125</sup> Navedeno pojačanje signala može se postići bliskim kontaktom hemozoina i površine plemenitih metala. Korištenjem zlata, SERS metodom su uspješno detektirane vrijednosti

parazitemije od 0,0005%.<sup>126</sup> Tehnike koje koriste srebrne nanočestice polučuju jednako dobre rezultate. U istraživanju iz 2016. godine, Chen i suradnici, sintetizirajući srebrne nanočestice unutar samih parazita i time ostvarujući njihov izravni kontakt s hemozoinom, uspješno su detektirali vrijednosti parazitemije od 0,00005%.<sup>125</sup>

Temeljem posebnih svojstva hemozoina poput paramagnetizma i novih magneto-optičkih tehnologija, razvijen je portabilni optički dijagnostički sustav (PODS; engl. *portable optical diagnostic system*) za svrhu njegove detekcije.<sup>127</sup> Paramagnetizam je prisutan zbog nesparenog broja elektrona u Fe<sup>3+</sup> ionima te se odnosi na pojavu orijentacije prethodno nasumično orijentiranih molekularnih magnetskih dipola u smjeru vanjskog magnetskog polja kada se ono uključi.<sup>84</sup> Svjetlost laserske diode, valne duljine 635 nm prolazi kroz mikrokivetu koja sadrži 500  $\mu$ L uzorka te dopijeva do fotodetektora. Mjerenje se obavlja u dva navrata, s i bez magnetske aktivnosti. Kako magnet privlači magnetske nanočestice i time ih pomiče izvan laserskog snopa svjetlosti, postojat će razlika u konačnom intenzitetu signala, proporcionalna upravo koncentraciji nanočestica. Korištenjem tog sustava bez potrebe drugih reagensa, uspješno su detektirane vrijednosti  $\beta$ -hematina, sintetske molekule identične hemozoinu, od <0.0081  $\mu$ g/mL u 500  $\mu$ L krvi zeca. Ta vrijednost odgovara broju manjem od 26 parazita po  $\mu$ L krvi, odnosno slične je osjetljivosti kao i druge relevantne metode dijagnostike.<sup>127</sup>

Nedavno, 2019. godine došlo je do napretka i u polju elektrokemijskih biosenzora putem kojih se uspješno detektirao  $\beta$ -hematin, no zbog skupe tehnologije kao i pada u stabilnosti elektroda nakon određenog vremena rada i činjenice da je osjetljivost standardnih metoda u detekciji veća, primjenjivost ove metode u rutinskoj dijagnostici je upitna.<sup>120,128</sup>

Uz biosenzore, razvijaju se i raznovrsni tzv. LOC (engl. *lab-on-a-chip*) uređaji koji koriste svojstva hemozoina u dijagnostičke svrhe. To su mali portabilni uređaji koji imaju nekoliko integriranih laboratorijskih funkcija, i koji bi trebali omogućiti primjenu na terenu.<sup>120</sup> Jedan takav uređaj, konstruiran od strane Kong i sur., koristi mikrofluidnu marginaciju stanica kojom se razdvajaju inficirani od neinficiranih eritrocita temeljem razlike u njihovoj deformabilnosti i potom MMR (engl. *magnetic resonance relaxometry*) metodu koja iskorištava paramagnetska svojstva hemozoina. Tim su postupkom uspješno detektirane vrijednosti parazitemije od 0,0005%, što je ekvivalentno vrijednosti od 50 parazita po  $\mu$ L krvi.<sup>34</sup> Osim navedenog, postoje i brojni drugi pokušaji u korištenju paramagnetičkih svojstva hemozoina na LOC uređajima.<sup>120,130–132</sup>

Kako hemozoin posjeduje i fotoakustična svojstva, neka istraživanja razmatraju i njihovu ulogu u dijagnostici. Fotoakustički spektar nekog uzorka dobiva se njegovim osvjetljavanjem intenzivnim svjetlom i mjerenjem nastalih akustičnih vibracija u materijalu na različitim frekvencijama. Taj se spektar

može koristiti za identifikaciju apsorbirajućih komponenata uzorka i na taj način otkrivanje sitnih promjena u njegovom sastavu.<sup>84</sup> U istraživanju iz 2014. godine, Lukianova-Hleb i sur. prikazali su mogućnost transdermalne detekcije hemozoina, koji generira prolazni nano-mjehurić pare (H-VNB; engl. *hemozoin-induced vapor nanobubble*) u odgovoru na podražaj laserom u trajanju od jedne pikosekunde. Novonastali mjehurići stvaraju akustične signale koji se detektiraju ultrazvučnim transduktorom, omogućujući time neinvazivnu detekciju prisustva inficiranih eritrocita. Navedenom metodom, odašiljući 400 laserskih pulseva u 20 sekundi (valne duljine 672 nm, energije 15  $\mu$ J) i primajući akustične odgovore za svaki impuls, uspješno su dektirane infekcije u miševa inficiranih s *P. yoelii*.<sup>133</sup>

## 4.5 Molekularna dijagnostika

Molekularna dijagnostika temelji se na detekciji nukleinskih kiselina plazmodija te pruža testove s visokom specifičnošću i osjetljivošću.<sup>116</sup> Postupkom lančane reakcije polimerazom (PCR; engl. *polymerase chain reaction*), koju je 1983. razvio Kary Mullis, koristeći specifične početnice (engl. *primers*) i termostabilnu DNA-polimerazu opetovano se umnaža određeni segment DNA, koji će se potom detektirati elektroforezom u gelu, *Southern blot*-analizom ili nekim drugim postupkom.<sup>134,135</sup> PCR je u rutinskoj dijagnostici najspecifičnija i najosjetljivija metoda za detekciju plazmodija, pogotovo u slučajevima malarije s niskom razinom parazitemije, omogućujući detekciju i manje od 5 parazita na  $\mu\text{L}$  krvi.<sup>5</sup> No osim konvencionalne PCR metode, u detekciji je moguće pristupiti različitim drugim PCR tehnikama. (tabl. 2)<sup>116,134,136–138</sup>

**Tablica 2;** Tehnike PCR metode

Tehnika	Postupak
Konvencionalni PCR	Zagrijavanje dovodi do denaturacije tj. razdvajanja lanaca molekule DNA. Tada se dodaju oligonukleotidne početnice koje određuju početak i kraj ciljne sekvencu te se termostabilnom DNA-polimerazom sintetiziraju novi lanci. Kroz opetovane cikluse hlađenja i zagrijavanja ciljna se sekvenca umnaža.
Ugniježđeni PCR (engl. <i>nested PCR</i> )	Dva seta početnica se koriste u sukcesivnim reakcijama. Drugi set početnica veže se za produkt prvog PCR-kruga i umnaža manji fragment, već inicijalno amplificiranog segmenta.
Multipli PCR (engl. <i>multiplex PCR</i> )	U jednoj reakcijskoj smjesi nalazi se više kompleta primera. Omogućuje simultanu detekciju više nukleinskih kiselina tj. različitih vrsta plazmodija.
Djelom-ugnijedeni multipli PCR (snM-PCR; engl. <i>semi-nested multiplex PCR</i> )	Za razliku od ugniježđenog PCR-a u drugom se krugu amplifikacije koristi kombinacija drugih specifičnih početnica i početnica korištenih u prvom krugu amplifikacije.
PCR u realnom vremenu (qPCR; engl. <i>quantitative real-time PCR</i> )	Amplifikacija ciljne nukleinske kiseline i detekcija amplifikata događaju se istovremeno. Početnice su označene fluorescentnom bojom i aparat bilježi svako pojedino spajanje te tako omogućuje kvantifikaciju ciljne nukleinske kiseline usporedbom sa standardnim krivuljama amplifikacije.
PCR postupkom obrnute transkriptaze (RT-PCR; engl. <i>reverse-transcriptase PCR</i> )	Uključuje pretvorbu RNA u cDNA enzimom reverzne transkriptaze i potom amplifikaciju segmenta cDNA specifičnim početnicama.
CLIP-PCR (engl. <i>capture and ligation probe PCR</i> )	Uzorak se krvi lizira kako bi se oslobodila 18s rRNA. Tijekom inkubacije dodaju se hvatačke i detekcijske probe koje vežu ciljnu sekvencu 18s rRNA. Hvatačke probe usidruju ciljnu sekvencu za čvrstu površinu, a detekcijske probe locirane na krajevima ciljne sekvence sadže regiju za vezanje univerzalnih primera, koji omogućuju kvantifikaciju qPCR metodom. Visoka osjetljivost; moguća je detekcija i pri vrijednosti od 0,01 parazita po $\mu\text{L}$ krvi.

Nedavno je razvijena nova jednostavna i brza imunokromatografska metoda detekcije nukleinskih kiselina nazvana NALFIA (engl. *nucleic acid lateral flow immunoassay*). Detektira amplificirane fragmente nukleinskih kiselina dobivenih PCR metodom, koristeći nitroceluloznu podlogu obloženu specifičnim protutijelima. Rezultati su vidljivi unutar 10 do 20 minuta, lako se očitavaju i detekcijska granica same metode iznosi između 0,3 i 3 parazita po  $\mu\text{L}$  krvi.<sup>139</sup> Varijanta iste metode, nazvana db-PCR-NALFIA (engl. *direct-on-blood PCR nucleic acid lateral flow immunoassay*) čija je glavna prednost što je jednostavnija, budući da ne zahtijeva pripremu uzorka tj. postupke izolacije DNA, može poslužiti kao praktično i efikasno sredstvo u dijagnostici.<sup>140</sup>

Osim lančane reakcije polimerazom postoje i druge laboratorijske metode koje imaju svoju ulogu u dijagnostici malarije. LAMP (engl. *loop mediated isothermal amplification*) je često korištena amplifikacijska metoda u dijagnostici u kojoj četiri primera prepoznaju šest specifičnih regija ciljanog gena.<sup>135</sup> U malarije se njome može odrediti infekcija nespecifično za rod *Plasmodium* i specifično za *P. falciparum* te *P. vivax*, dok se preostali uzročnici ne mogu identificirati na razini vrste.<sup>137</sup> Stoga, ova metoda dijeli sličan problem kao i brzi antigenski testovi.<sup>5</sup> S druge strane, cijeli postupak traje kraće od sat vremena, za njega nije potrebna prethodna ekstrakcija nukleinskih kiselina i reakcija se odvija izotermalno, što znači da ne zahtjeva dodatnu posebnu opremu (termocikler).<sup>135</sup> U preglednom radu iz 2021., kojega su proveli Antinori i sur., obuhvaćen je broj od 6289 testiranih uzoraka LAMP metodom u ne-endemskim zemljama te je dobiven podatak o rasponu osjetljivosti (93,9% - 100%) i specifičnosti (93,8% - 100%). Kao takva, mogla poslužiti kao vrijedna metoda u probiru malarije za ne-endemske zemlje.<sup>141</sup> Varijanta metode nazvana HTP-LAMP (engl. *high throughput loop-mediated isothermal amplification*) omogućuje obradu i do 94 uzoraka istovremeno s visokom osjetljivošću (98,6%) u usporedbi s PCR-om.<sup>142</sup>

NASBA (engl. *nucleic acid sequence-based amplification*) je amplifikacijska metoda kojom se može detektirati plazmodijalna RNA. Nakon ekstrakcije nukleinskih kiselina slijedi postupak amplifikacije u trajanju od 90 min, koji se odvija uz tri enzima: Reverzna transkriptaza, RNaza H i T7 RNA polimeraza. Glavna je prednost metode što se reakcija odvija izotermalno na temperaturi od 41°C. Njome je, uz detekciju aseksualnih razvojnih stadija plazmodija, moguće detektirati i seksualne stadije ciljanjem Pfs16 mRNA i Pfs25 mRNA (u slučaju *P. falciparum*) s osjetljivošću od 1 seksualni stadij na  $\mu\text{L}$  krvi.<sup>137,143</sup>

SHERLOCK (engl. *specific high sensitivity enzymatic reporter unlocking*) je metoda temeljena na CRISPR (engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) sustavu. Koristeći Cas (engl. *CRISPR associated system*) endonukleaze, programirane putem CRISPR gRNA (engl. *guide RNA*) za cijepanje i specifičnu detekciju DNA, uspješno su detektirani *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* i *P.*

*malariae*. Endonukleaza odabrana u slučaju ove metode bila je Cas12a. Ona se aktivira prepoznavanjem ciljane dvolančane DNA (dsDNA) i tada pokazuje nediskriminirajuću i nespecifičnu aktivnost DNaze, cijepajući sve ne-targetirane DNA molekule. Degradacijom fluorofor-gasiteljem označenih reporter-jednolačanih DNA (ssDNA; *engl. single stranded DNA*) uspješno se detektira prisustvo tražene dsDNA pojavom fluorescencije. Kako bi se povećala osjetljivost metode, dodan je RT-RPA (*engl. reverse-transcriptase recombinase polymerase amplification*) postupak prije Cas12a detekcije radi povećanja koncentracije ciljane DNA. RPA je izotermička amplifikacija nukleinskih kiselina koja uključuje tri enzima: Rekombinazu, ssDNA-vežući protein i polimerazu zamjene lanca (*engl. strand-displacing polymerase*) koja koordinira DNA sintezu iz početnice vezane za ciljnu DNA. Glavne prednosti SHERLOCK metode jesu pojednostavljena priprema uzoraka bez ekstrakcije nukleinskih kiselina, izotermalni uvjeti (40°C) bez potrebe termociklera te moguće očitavanje rezultata na terenu imunokromatografskom trakicom ili prijenosnim fluorimetrom. Osjetljivost same metode varira s obzirom na razinu parazitemije, pri čemu je detekcijska granica između 0,36 i 1,9 parazita po µL krvi, ovisno o vrsti plazmodija.<sup>144</sup>

Unatoč činjenici da su molekularne metode preciznije od mikroskopije, jer omogućuju detekciju mješovitih infekcija kao i submikroskopskih odnosno subkliničkih infekcija, njihova je uporaba ograničena, jer osim visoke cijene opreme i reagensa koji su preskupi za zemlje u kojima je malarija endemična, zahtijevaju i uvježbano osoblje, precizno pipetiranje, stabilan izvor energije te dobru laboratorijsku infrastrukturu.<sup>137</sup> Reagensi za PCR su stabilni na +4°C, no u idealnim uvjetima trebali bi se moći skladištiti i pri temperaturama do +40°C za primjenu na terenu.<sup>140</sup>



## 4.6 Aptamerima posredovana dijagnostika

Aptameri ili tzv. „kemijska protutijela“ su umjetni jednolančani RNA ili DNA oligonukleotidi čija im jedinstvena trodimenzionalna struktura omogućuje vezanje za molekularne mete, tipično proteine, s visokom specifičnošću i aviditetom.<sup>136,145</sup> Uspoređujući ih s monoklonskim protutijelima imaju nekoliko prednosti. Budući da je sinteza aptamera striktno kemijska, postoji manji rizik od kontaminacije, dok monoklonska protutijela zahtijevaju životinjske modele i kulture stanica. Jednako tako, protutijela zahtijevaju ciljnu molekulu koja je imunogenična, dok aptameri mogu vezati različite molekule bez obzira na njihovu imunogeničnost, kao što su proteini, ioni metala, toksini, stanice i tkiva.<sup>145</sup> Protokol sinteze aptamera nazvan SELEX (engl. *systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) odvija se u nekoliko koraka koji uključuju inkubaciju, selekciju, podjelu i amplifikaciju. Postupak započinje inkubacijom zbirke nukleinskih kiselina nasumičnih sekvenci (do  $10^{16}$  različitih sekvenci) zajedno s ciljnom molekulom. Određene će se nukleinske kiseline vezati za istu, dok druge neće. Sekvence sa većim afinitetom se odvajaju i potom amplificiraju lančanom reakcijom polimeraze. Umnožene sekvence se potom ponovno inkubiraju s ciljnom molekulom i postupak se ponavlja dok se ne izoliraju sekvence s najvećim afinitetom.<sup>146</sup> Postupak sadrži i druge dodatne korake poput negativne selekcije, kojom se aptameri koji prepoznaju alternativne ciljeve odbacuju, a ovi koji ne prepoznaju zadržavaju. Primjena aptamera u detekciji *Plasmodium spp.* pokazala se primjenjiva već za nekoliko proteina poput *PfLDH*,<sup>147,148</sup> *PvLDH*,<sup>149</sup> *PfEMP1*,<sup>150</sup> *PfGDH*<sup>151</sup> i *PfHRP2*.<sup>152</sup>

Osim u dijagnostici, aptameri imaju potencijal i za korištenje i u terapijske svrhe, npr. anti-VEGF aptamer *Pegaptanib* za liječenje makularne degeneracije.<sup>153</sup> Glede njihova korištenja u liječenju malarije, Niles i sur., razvili su hem-vežuće aptamere koji inhibiraju formaciju hemozoina *in vitro*, polučujući posljedično toksični učinak na parazite.<sup>154</sup> Daljnjim napretkom tehnologije i znanja, aptameri postaju obećavajuće sredstvo za dijagnostičke i terapijske svrhe parazitarnih infekcija.<sup>145</sup>

## **Zahvale**

Zahvaljujem se mentoru izv. prof. dr. sc. Mariju Svibenu na pruženoj pomoći pri pisanju i ispravljanju samoga rada, kao i na zanimljivim predavanjima kojima me tijekom nastave uveo u svijet parazitologije.

Zahvaljujem se svim kolegama koji su mi davali prijedloge i pomogli mi tako u pisanju rada.

Hvala Morani Belović na potpori i iščitavanju rada.

## Literatura

1. Laveran CLA, Kean BH, Mott KE, Russell AJ. A Newly Discovered Parasite in the Blood of Patients Suffering from Malaria. Parasitic Etiology of Attacks of Malaria. *Rev Infect Dis.* 1982;4(4):908-911.
2. Hempelmann E, Krafts K. Bad air, amulets and mosquitoes: 2,000 years of changing perspectives on malaria. *Malar J.* 2013;12:232. doi:10.1186/1475-2875-12-232
3. Drugs I of M (US) C on the E of A, Arrow KJ, Panosian C, Gelband H. *A Brief History of Malaria.* National Academies Press (US); 2004. Accessed November 5, 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK215638/>
4. Stevenson A. *Oxford Dictionary of English.* OUP Oxford; 2010.
5. Malaria and Babesiosis. In: *Diagnostic Medical Parasitology.* John Wiley & Sons, Ltd; 2016:719-777. doi:10.1128/9781555819002.ch26
6. Clements AN. *The Physiology of Mosquitoes.* Pergamon Press Limited; 1963.
7. Berman JJ. *Taxonomic Guide to Infectious Diseases: Understanding the Biologic Classes of Pathogenic Organisms.* Second edition. Academic Press, an imprint of Elsevier; 2019.
8. Fuehrer HP, Noedl H. Recent Advances in Detection of *Plasmodium ovale*: Implications of Separation into the Two Species *Plasmodium ovale wallikeri* and *Plasmodium ovale curtisi*. *J Clin Microbiol.* 2014;52(2):387-391. doi:10.1128/JCM.02760-13
9. Simner PJ. Medical Parasitology Taxonomy Update: January 2012 to December 2015. *J Clin Microbiol.* 2017;55(1):43-47. doi:10.1128/JCM.01020-16
10. Sutherland CJ, Tanomsing N, Nolder D, et al. Two Nonrecombining Sympatric Forms of the Human Malaria Parasite *Plasmodium ovale* Occur Globally. *J Infect Dis.* 2010;201(10):1544-1550. doi:10.1086/652240
11. Bykersma A. The New Zoonotic Malaria: *Plasmodium cynomolgi*. *Trop Med Infect Dis.* 2021;6(2):46. doi:10.3390/tropicalmed6020046

12. Ramasamy R. Zoonotic Malaria – Global Overview and Research and Policy Needs. *Front Public Health*. 2014;2:123. doi:10.3389/fpubh.2014.00123
13. Dian ND, Rahim MAFA, Chan S, Idris ZM. Non-Human Primate Malaria Infections: A Review on the Epidemiology in Malaysia. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19(13):7888. doi:10.3390/ijerph19137888
14. Antinori S, Galimberti L, Milazzo L, Corbellino M. *Plasmodium knowlesi*: The emerging zoonotic malaria parasite. *Acta Trop*. 2013;125(2):191-201. doi:10.1016/j.actatropica.2012.10.008
15. Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, et al. A global map of dominant malaria vectors. *Parasit Vectors*. 2012;5:69. doi:10.1186/1756-3305-5-69
16. Hinne IA, Attah SK, Mensah BA, Forson AO, Afrane YA. Larval habitat diversity and *Anopheles* mosquito species distribution in different ecological zones in Ghana. *Parasit Vectors*. 2021;14(1):193. doi:10.1186/s13071-021-04701-w
17. Clements AN. *The Biology of Mosquitoes: Sensory Reception and Behaviour*. CABI Publishing Inc.; 1999.
18. Castro MC. Malaria Transmission and Prospects for Malaria Eradication: The Role of the Environment. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017;7(10):a025601. doi:10.1101/cshperspect.a025601
19. Rossati A, Bargiacchi O, Kroumova V, Zaramella M, Caputo A, Garavelli PL. Climate, environment and transmission of malaria. *Infez Med*. 2016;24(2):93-104.
20. Piperaki ET, Daikos GL. Malaria in Europe: emerging threat or minor nuisance? *Clin Microbiol Infect*. 2016;22(6):487-493. doi:10.1016/j.cmi.2016.04.023
21. World malaria report 2022. Accessed February 21, 2023. <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2022>
22. Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2021. g. Accessed April 20, 2023. <https://www.hzjz.hr/hrvatski-zdravstveno-statisticki-ljetopis/hrvatski-zdravstveno-statisticki-ljetopis-za-2021-g/>

23. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. World Population Prospects, Online Edition. Published online 2022.
24. Moreira CK, Templeton TJ, Lavazec C, et al. The *Plasmodium* TRAP/MIC2 family member, TRAP-Like Protein (TLP), is involved in tissue traversal by sporozoites. *Cell Microbiol.* 2008;10(7):1505-1516. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01143.x
25. Heintzelman MB. Gliding motility in apicomplexan parasites. *Semin Cell Dev Biol.* 2015;46:135-142. doi:10.1016/j.semcdb.2015.09.020
26. Tavares J, Formaglio P, Thiberge S, et al. Role of host cell traversal by the malaria sporozoite during liver infection. *J Exp Med.* 2013;210(5):905-915. doi:10.1084/jem.20121130
27. Risco-Castillo V, Topçu S, Marinach C, et al. Malaria Sporozoites Traverse Host Cells within Transient Vacuoles. *Cell Host Microbe.* 2015;18(5):593-603. doi:10.1016/j.chom.2015.10.006
28. Cowman AF, Healer J, Marapana D, Marsh K. Malaria: Biology and Disease. *Cell.* 2016;167(3):610-624. doi:10.1016/j.cell.2016.07.055
29. Herrera R, Anderson C, Kumar K, et al. Reversible Conformational Change in the *Plasmodium falciparum* Circumsporozoite Protein Masks Its Adhesion Domains. *Infect Immun.* 2015;83(10):3771-3780. doi:10.1128/IAI.02676-14
30. Francia ME, Striepen B. Cell division in apicomplexan parasites. *Nat Rev Microbiol.* 2014;12(2):125-136. doi:10.1038/nrmicro3184
31. Verhoef JMJ, Meissner M, Kooij TWA. Organelle Dynamics in Apicomplexan Parasites. *mBio.* 12(4):e01409-21. doi:10.1128/mBio.01409-21
32. Sturm A, Amino R, van de Sand C, et al. Manipulation of Host Hepatocytes by the Malaria Parasite for Delivery into Liver Sinusoids. *Science.* 2006;313(5791):1287-1290. doi:10.1126/science.1129720
33. Weiss GE, Crabb BS, Gilson PR. Overlaying Molecular and Temporal Aspects of Malaria Parasite Invasion. *Trends Parasitol.* 2016;32(4):284-295. doi:10.1016/j.pt.2015.12.007

34. Molina-Franky J, Patarroyo ME, Kalkum M, Patarroyo MA. The Cellular and Molecular Interaction Between Erythrocytes and *Plasmodium falciparum* Merozoites. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12:816574. doi:10.3389/fcimb.2022.816574
35. Golassa L, Amenga-Etego L, Lo E, Amambua-Ngwa A. The biology of unconventional invasion of Duffy-negative reticulocytes by *Plasmodium vivax* and its implication in malaria epidemiology and public health. *Malar J.* 2020;19(1):299. doi:10.1186/s12936-020-03372-9
36. Begovac J. *Klinička infektologija*. Medicinska naklada; 2019.
37. Gallagher PG. Chapter 45 - Red Blood Cell Membrane Disorders. In: Hoffman R, Benz EJ, Silberstein LE, et al., eds. *Hematology (Seventh Edition)*. Elsevier; 2018:626-647. doi:10.1016/B978-0-323-35762-3.00045-7
38. Pritt BS. *Plasmodium* and *Babesia*. In: *Manual of Clinical Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd; 2015:2338-2356. doi:10.1128/9781555817381.ch136
39. Gerald N, Mahajan B, Kumar S. Mitosis in the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum* ▽. *Eukaryot Cell.* 2011;10(4):474-482. doi:10.1128/EC.00314-10
40. Mantooth M, Zeibig E. Select Sporozoa: *Plasmodium* and *Babesia*. In: *Clinical Parasitology*. Saunders; 2012:129-158.
41. Sato S. *Plasmodium*—a brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology. *J Physiol Anthropol.* 2021;40:1. doi:10.1186/s40101-020-00251-9
42. Josling GA, Williamson KC, Llinás M. Regulation of Sexual Commitment and Gametocytogenesis in Malaria Parasites. *Annu Rev Microbiol.* 2018;72:501-519. doi:10.1146/annurev-micro-090817-062712
43. Bruce MC, Alano P, Duthie S, Carter R. Commitment of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* to sexual and asexual development. *Parasitology.* 1990;100 Pt 2:191-200. doi:10.1017/s0031182000061199
44. Sinha A, Hughes KR, Modrzynska KK, et al. A cascade of DNA binding proteins for sexual commitment and development in *Plasmodium*. *Nature.* 2014;507(7491):253-257. doi:10.1038/nature12970

45. Kafsack BFC, Rovira-Graells N, Clark TG, et al. A transcriptional switch underlies commitment to sexual development in human malaria parasites. *Nature*. 2014;507(7491):248-252. doi:10.1038/nature12920
46. Brancucci NMB, Gerdt JP, Wang C, et al. Lysophosphatidylcholine Regulates Sexual Stage Differentiation in the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Cell*. 2017;171(7):1532-1544.e15. doi:10.1016/j.cell.2017.10.020
47. Regev-Rudzki N, Wilson DW, Carvalho TG, et al. Cell-Cell Communication between Malaria-Infected Red Blood Cells via Exosome-like Vesicles. *Cell*. 2013;153(5):1120-1133. doi:10.1016/j.cell.2013.04.029
48. Josling GA, Llinás M. Sexual development in *Plasmodium* parasites: knowing when it's time to commit. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13(9):573-587. doi:10.1038/nrmicro3519
49. Mantel PY, Hoang AN, Goldowitz I, et al. Malaria infected erythrocyte-derived microvesicles mediate cellular communication within the parasite population and with the host immune system. *Cell Host Microbe*. 2013;13(5):521-534. doi:10.1016/j.chom.2013.04.009
50. Sinden RE. The cell biology of sexual development in *Plasmodium*. *Parasitology*. 1983;86(4):7-28. doi:10.1017/S0031182000050824
51. Frischknecht F, Matuschewski K. *Plasmodium* Sporozoite Biology. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017;7(5):a025478. doi:10.1101/cshperspect.a025478
52. Patil H, Hughes KR, Lemgruber L, et al. Zygote morphogenesis but not the establishment of cell polarity in *Plasmodium berghei* is controlled by the small GTPase, RAB11A. *PLoS Pathog*. 2020;16(5):e1008091. doi:10.1371/journal.ppat.1008091
53. van der Watt ME, Reader J, Birkholtz LM. Adapt or Die: Targeting Unique Transmission-Stage Biology for Malaria Elimination. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12. Accessed July 12, 2023. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2022.901971>
54. Bannister LH, Mitchell GH. The malaria merozoite, forty years on. *Parasitology*. 2009;136(12):1435-1444. doi:10.1017/S0031182009990734
55. Hanssen E, McMillan PJ, Tilley L. Cellular architecture of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Int J Parasitol*. 2010;40(10):1127-1135. doi:10.1016/j.ijpara.2010.04.012

56. Bannister LH, Dluzewski AR. The ultrastructure of red cell invasion in malaria infections: a review. *Blood Cells*. 1990;16(2-3):257-292; discussion 293-297.
57. Riglar DT, Rogers KL, Hanssen E, et al. Spatial association with PTEX complexes defines regions for effector export into *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Nat Commun*. 2013;4:1415. doi:10.1038/ncomms2449
58. Ferreira JL, Heincke D, Wichers JS, Liffner B, Wilson DW, Gilberger TW. The Dynamic Roles of the Inner Membrane Complex in the Multiple Stages of the Malaria Parasite. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;10:611801. doi:10.3389/fcimb.2020.611801
59. Lim L, McFadden GI. The evolution, metabolism and functions of the apicoplast. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2010;365(1541):749-763. doi:10.1098/rstb.2009.0273
60. Van Dooren GG, Stimmler LM, McFadden GI. Metabolic maps and functions of the *Plasmodium* mitochondrion. *FEMS Microbiol Rev*. 2006;30(4):596-630. doi:10.1111/j.1574-6976.2006.00027.x
61. Stanway RR, Witt T, Zobiak B, Aepfelbacher M, Heussler VT. GFP-targeting allows visualization of the apicoplast throughout the life cycle of live malaria parasites. *Biol Cell*. 2009;101(7):415-435. doi:10.1042/BC20080202
62. Goldberg DE, Zimmerberg J. Hardly Vacuous: The Parasitophorous Vacuolar Membrane of Malaria Parasites. *Trends Parasitol*. 2020;36(2):138-146. doi:10.1016/j.pt.2019.11.006
63. Garten M, Beck JR, Roth R, et al. Contacting domains segregate a lipid transporter from a solute transporter in the malarial host–parasite interface. *Nat Commun*. 2020;11:3825. doi:10.1038/s41467-020-17506-9
64. Boddey JA, Cowman AF. *Plasmodium* Nesting: Remaking the Erythrocyte from the Inside Out. *Annu Rev Microbiol*. 2013;67(1):243-269. doi:10.1146/annurev-micro-092412-155730
65. Przyborski JM, Nyboer B, Lanzer M. Ticket to ride: export of proteins to the *Plasmodium falciparum* -infected erythrocyte. *Mol Microbiol*. 2016;101(1):1-11. doi:10.1111/mmi.13380
66. Hiller NL, Bhattacharjee S, van Ooij C, et al. A Host-Targeting Signal in Virulence Proteins Reveals a Secretome in Malarial Infection. *Science*. 2004;306(5703):1934-1937. doi:10.1126/science.1102737



67. Spielmann T, Gilberger TW. Protein export in malaria parasites: do multiple export motifs add up to multiple export pathways? *Trends Parasitol.* 2010;26(1):6-10. doi:10.1016/j.pt.2009.10.001
68. Grüring C, Heiber A, Kruse F, et al. Uncovering common principles in protein export of malaria parasites. *Cell Host Microbe.* 2012;12(5):717-729. doi:10.1016/j.chom.2012.09.010
69. Batinovic S, McHugh E, Chisholm SA, et al. An exported protein-interacting complex involved in the trafficking of virulence determinants in *Plasmodium*-infected erythrocytes. *Nat Commun.* 2017;8:16044. doi:10.1038/ncomms16044
70. de Koning-Ward TF, Gilson PR, Boddey JA, et al. A novel protein export machine in malaria parasites. *Nature.* 2009;459(7249):945-949. doi:10.1038/nature08104
71. Mundwiler-Pachlatko E, Beck HP. Maurer's clefts, the enigma of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;110(50):19987-19994. doi:10.1073/pnas.1309247110
72. Oberli A, Slater LM, Cutts E, et al. A *Plasmodium falciparum* PHIST protein binds the virulence factor PfEMP1 and comigrates to knobs on the host cell surface. *FASEB J.* 2014;28(10):4420-4433. doi:10.1096/fj.14-256057
73. Warncke JD, Vakonakis I, Beck HP. *Plasmodium* Helical Interspersed Subtelomeric (PHIST) Proteins, at the Center of Host Cell Remodeling. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR.* 2016;80(4):905-927. doi:10.1128/MMBR.00014-16
74. Smith JD, Rowe JA, Higgins MK, Lavstsen T. Malaria's Deadly Grip: Cytoadhesion of *Plasmodium falciparum* Infected Erythrocytes. *Cell Microbiol.* 2013;15(12):10.1111/cmi.12183. doi:10.1111/cmi.12183
75. Moxon CA, Gibbins MP, McGuinness D, Milner DA, Marti M. New Insights into Malaria Pathogenesis. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2020;15(1):315-343. doi:10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032640
76. Kaviratne M, Khan SM, Jarra W, Preiser PR. Small Variant STEVOR Antigen Is Uniquely Located within Maurer's Clefts in *Plasmodium falciparum*-Infected Red Blood Cells. *Eukaryot Cell.* 2002;1(6):926-935. doi:10.1128/EC.1.6.926-935.2002

77. Niang M, Bei AK, Madnani KG, et al. The variant STEVOR protein of *Plasmodium falciparum* is a red cell binding protein important for merozoite invasion and rosetting. *Cell Host Microbe*. 2014;16(1):81-93. doi:10.1016/j.chom.2014.06.004
78. Khattab A, Klinkert MQ. Maurer's Clefs-Restricted Localization, Orientation and Export of a *Plasmodium falciparum* RIFIN. *Traffic*. 2006;7(12):1654-1665. doi:10.1111/j.1600-0854.2006.00494.x
79. Goel S, Palmkvist M, Moll K, et al. RIFINs are adhesins implicated in severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Nat Med*. 2015;21(4):314-317. doi:10.1038/nm.3812
80. Ho M, Davis TM, Silamut K, Bunnag D, White NJ. Rosette formation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes from patients with acute malaria. *Infect Immun*. 1991;59(6):2135-2139.
81. Asare KK, Sakaguchi M, Lucky AB, et al. The *Plasmodium knowlesi* MAHRP2 ortholog localizes to structures connecting Sinton Mulligan's clefs in the infected erythrocyte. *Parasitol Int*. 2018;67(4):481-492. doi:10.1016/j.parint.2018.04.005
82. Pachlatko E, Rusch S, Müller A, et al. MAHRP2, an exported protein of *Plasmodium falciparum*, is an essential component of Maurer's cleft tethers. *Mol Microbiol*. 2010;77(5):1136-1152. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07278.x
83. Pei X, Guo X, Coppel R, Mohandas N, An X. *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 3 (PfEMP3) Destabilizes Erythrocyte Membrane Skeleton \*. *J Biol Chem*. 2007;282(37):26754-26758. doi:10.1074/jbc.M701612200
84. Coronado LM, Nadovich CT, Spadafora C. Malarial hemozoin: From target to tool. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj*. 2014;1840(6):2032-2041. doi:10.1016/j.bbagen.2014.02.009
85. Lew VL, Tiffert T, Ginsburg H. Excess hemoglobin digestion and the osmotic stability of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Blood*. 2003;101(10):4189-4194. doi:10.1182/blood-2002-08-2654
86. Klonis N, Tan O, Jackson K, Goldberg D, Klemba M, Tilley L. Evaluation of pH during cytosomal endocytosis and vacuolar catabolism of haemoglobin in *Plasmodium falciparum*. *Biochem J*. 2007;407(Pt 3):343-354. doi:10.1042/BJ20070934

87. Elsworth B, Keroack CD, Duraisingh MT. Elucidating Host Cell Uptake by Malaria Parasites. *Trends Parasitol.* 2019;35(5):333-335. doi:10.1016/j.pt.2019.03.005
88. Severe Malaria. *Trop Med Int Health.* 2014;19(s1):7-131. doi:10.1111/tmi.12313\_2
89. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJB. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 9th Edition.* Elsevier; 2019.
90. Akide Ndunge OB, Kilian N, Salman MM. Cerebral Malaria and Neuronal Implications of *Plasmodium Falciparum* Infection: From Mechanisms to Advanced Models. *Adv Sci.* 2022;9(36):2202944. doi:10.1002/advs.202202944
91. Dayanand KK, Achur RN, Gowda DC. Epidemiology, Drug Resistance, and Pathophysiology of *Plasmodium vivax* Malaria. *J Vector Borne Dis.* 2018;55(1):1. doi:10.4103/0972-9062.234620
92. Vinetz JM, Li J, McCutchan TF, Kaslow DC. *Plasmodium malariae* Infection in an Asymptomatic 74-Year-Old Greek Woman with Splenomegaly. *N Engl J Med.* 1998;338(6):367-371. doi:10.1056/NEJM199802053380605
93. Markus MB. Biological concepts in recurrent *Plasmodium vivax* malaria. *Parasitology.* 2018;145(13):1765-1771. doi:10.1017/S003118201800032X
94. Markus MB. Do hypnozoites cause relapse in malaria? *Trends Parasitol.* 2015;31(6):239-245. doi:10.1016/j.pt.2015.02.003
95. Markus MB. Transition from Plasmodial Hypnozoite to Schizont Demonstrated. *Trends Parasitol.* 2020;36(5):407-408. doi:10.1016/j.pt.2020.01.011
96. Richter J, Franken G, Mehlhorn H, Labisch A, Häussinger D. What is the evidence for the existence of *Plasmodium ovale* hypnozoites? *Parasitol Res.* 2010;107(6):1285-1290. doi:10.1007/s00436-010-2071-z
97. Markus MB. The hypnozoite concept, with particular reference to malaria. *Parasitol Res.* 2011;108(1):247-252. doi:10.1007/s00436-010-2072-y
98. Collins WE, Jeffery GM. *Plasmodium malariae*: Parasite and Disease. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(4):579-592. doi:10.1128/CMR.00027-07

99. Fleischer B. Editorial: 100 years ago: Giemsa's solution for staining of plasmodia. *Trop Med Int Health*. 2004;9(7):755-756. doi:10.1111/j.1365-3156.2004.01278.x
100. CDC - DPDx - Diagnostic Procedures - Blood Specimens. Published October 26, 2020. Accessed May 28, 2023. <https://www.cdc.gov/dpdx/diagnosticprocedures/blood/specimencoll.html>
101. CDC - DPDx - Malaria. Published October 26, 2020. Accessed June 2, 2023. <https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html>
102. World Health Organization. *Bench aids for the diagnosis of malaria infections*. World Health Organization; 2000. Accessed May 28, 2023. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42195>
103. World Health Organisation. Malaria parasite counting. Published online 2016. Accessed August 2, 2023. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/HTM-GMP-MM-SOP-09>
104. Wongsrichanalai C, Barcus MJ, Muth S, Sutamihardja A, Wernsdorfer WH. A Review of Malaria Diagnostic Tools: Microscopy and Rapid Diagnostic Test (RDT). In: *Defining and Defeating the Intolerable Burden of Malaria III: Progress and Perspectives: Supplement to Volume 77(6) of American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 2007. Accessed July 9, 2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1695/>
105. Kavanaugh MJ, Azzam SE, Rockabrand DM. Malaria Rapid Diagnostic Tests: Literary Review and Recommendation for a Quality Assurance, Quality Control Algorithm. *Diagnostics*. 2021;11(5):768. doi:10.3390/diagnostics11050768
106. Berthod D, Rochat J, Voumard R, Rochat L, Genton B, D'Acremont V. Self-diagnosis of malaria by travellers: a cohort study on the use of malaria rapid diagnostic tests provided by a Swiss travel clinic. *Malar J*. 2017;16(1):436. doi:10.1186/s12936-017-2079-2
107. Chiodini PL. Malaria diagnostics: now and the future. *Parasitology*. 2014;141(14):1873-1879. doi:10.1017/S0031182014001371
108. Wilson ML. Malaria Rapid Diagnostic Tests. *Clin Infect Dis*. 2012;54(11):1637-1641. doi:10.1093/cid/cis228
109. World Health Organisation. *Malaria Rapid Diagnostic Test Performance. Results of WHO Product Testing of Malaria RDTs: Round 4.*; 2012:19. Accessed June 7, 2023. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241504720>

110. Grobusch MP, Schlagenhauf P. 16 - Self-Diagnosis and Self-Treatment of Malaria by the Traveler. In: Keystone JS, Kozarsky PE, Connor BA, Nothdurft HD, Mendelson M, Leder K, eds. *Travel Medicine (Fourth Edition)*. Elsevier; 2019:169-178. doi:10.1016/B978-0-323-54696-6.00016-1
111. Cho CH, Nam MH, Kim JS, et al. Genetic variability in *Plasmodium vivax* aldolase gene in Korean isolates and the sensitivity of the Binax Now malaria test. *Trop Med Int Health*. 2011;16(2):223-226. doi:10.1111/j.1365-3156.2010.02691.x
112. Agarwal R, Choi L, Johnson S, Takwoingi Y. Rapid diagnostic tests for *Plasmodium vivax* malaria in endemic countries. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020;2020(11):CD013218. doi:10.1002/14651858.CD013218.pub2
113. Leshem E, Keller N, Guthman D, et al. False-Positive *Plasmodium falciparum* Histidine-Rich Protein 2 Immunocapture Assay Results for Acute Schistosomiasis Caused by *Schistosoma mekongi* ▽. *J Clin Microbiol*. 2011;49(6):2331-2332. doi:10.1128/JCM.00307-11
114. Picard-Maureau A, Hempelmann E, Krämmer G, Jackisch R, Jung A. [Glutathionestatus of *Plasmodium vinckei* parasitized erythrocytes in correlation to the intraerythrocytic development of the parasite (author's transl)]. *Tropenmed Parasitol*. 1975;26(4):405-416.
115. Kori LD, Valecha N, Anvikar AR. Glutamate dehydrogenase: a novel candidate to diagnose *Plasmodium falciparum* through rapid diagnostic test in blood specimen from fever patients. *Sci Rep*. 2020;10:6307. doi:10.1038/s41598-020-62850-x
116. Kalenić S. *Medicinska mikrobiologija*. Medicinska naklada; 2019.
117. Tangpukdee N, Duangdee C, Wilairatana P, Krudsood S. Malaria Diagnosis: A Brief Review. *Korean J Parasitol*. 2009;47(2):93-102. doi:10.3347/kjp.2009.47.2.93
118. Lee WJ, Kim HH, Hwang SM, et al. Detection of an antibody against *Plasmodium vivax* in residents of Gimpo-si, South Korea, using an indirect fluorescent antibody test. *Malar J*. 2011;10(1):19. doi:10.1186/1475-2875-10-19
119. Delahunst C, Horning MP, Wilson BK, Proctor JL, Hegg MC. Limitations of haemozoin-based diagnosis of *Plasmodium falciparum* using dark-field microscopy. *Malar J*. 2014;13:147. doi:10.1186/1475-2875-13-147

120. Baptista V, Peng WK, Minas G, Veiga MI, Catarino SO. Review of Microdevices for Hemozoin-Based Malaria Detection. *Biosensors*. 2022;12(2):110. doi:10.3390/bios12020110
121. Leksikografski zavod Miroslav Krleža. Biosenzor. Hrvatska enciklopedija. Published 2021. Accessed June 11, 2023. <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=7801>
122. Abshire JR, Rowlands CJ, Ganesan SM, So PTC, Niles JC. Quantification of labile heme in live malaria parasites using a genetically encoded biosensor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(11):E2068-E2076. doi:10.1073/pnas.1615195114
123. Leksikografski zavod Miroslav Krleža. Ramanova spektroskopija. Hrvatska enciklopedija. Published 2021. Accessed June 11, 2023. <https://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=51728>
124. Leksikografski zavod Miroslav Krleža. Ramanov efekt. Hrvatska enciklopedija. Published 2021. Accessed June 11, 2023. <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=51729>
125. Chen K, Yuen C, Aniweh Y, Preiser P, Liu Q. Towards ultrasensitive malaria diagnosis using surface enhanced Raman spectroscopy. *Sci Rep*. 2016;6:20177. doi:10.1038/srep20177
126. Garrett NL, Sekine R, Dixon MWA, Tilley L, Bamberg KR, Wood BR. Bio-sensing with butterfly wings: naturally occurring nano-structures for SERS-based malaria parasite detection. *Phys Chem Chem Phys*. 2015;17(33):21164-21168. doi:10.1039/C4CP04930F
127. McBirney SE, Chen D, Scholtz A, Ameri H, Armani AM. Rapid Diagnostic for Point-of-Care Malaria Screening. *ACS Sens*. 2018;3(7):1264-1270. doi:10.1021/acssensors.8b00269
128. Obisesan OR, Adekunle AS, Oyekunle JAO, Sabu T, Nkambule TTI, Mamba BB. Development of Electrochemical Nanosensor for the Detection of Malaria Parasite in Clinical Samples. *Front Chem*. 2019;7:89. doi:10.3389/fchem.2019.00089
129. Fook Kong T, Ye W, Peng WK, et al. Enhancing malaria diagnosis through microfluidic cell enrichment and magnetic resonance relaxometry detection. *Sci Rep*. 2015;5:11425. doi:10.1038/srep11425
130. Dupré A, Lei KM, Mak PI, Martins RP, Peng WK. Micro- and nanofabrication NMR technologies for point-of-care medical applications – A review. *Microelectron Eng*. 2019;209:66-74. doi:10.1016/j.mee.2019.02.005

131. Nam J, Huang H, Lim H, Lim C, Shin S. Magnetic Separation of Malaria-Infected Red Blood Cells in Various Developmental Stages. *Anal Chem*. 2013;85(15):7316-7323. doi:10.1021/ac4012057
132. Milesi F, Giacometti M, Coppadoro LP, Ferrari G, Fiore GB, Bertacco R. On-Chip Selective Capture and Detection of Magnetic Fingerprints of Malaria. *Sensors*. 2020;20(17):4972. doi:10.3390/s20174972
133. Lukianova-Hleb EY, Campbell KM, Constantinou PE, et al. Hemozoin-generated vapor nanobubbles for transdermal reagent- and needle-free detection of malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(3):900-905. doi:10.1073/pnas.1316253111
134. Cooper GM, Hausman RE. *Stanica*. Medicinska naklada; 2004.
135. Soroka M, Wasowicz B, Rymaszewska A. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): The Better Sibling of PCR? *Cells*. 2021;10(8):1931. doi:10.3390/cells10081931
136. Gitta B, Kilian N. Diagnosis of Malaria Parasites *Plasmodium* spp. in Endemic Areas: Current Strategies for an Ancient Disease. *BioEssays*. 2020;42(1):1900138. doi:10.1002/bies.201900138
137. Tedla M. A focus on improving molecular diagnostic approaches to malaria control and elimination in low transmission settings: Review. *Parasite Epidemiol Control*. 2019;6:e00107. doi:10.1016/j.parepi.2019.e00107
138. Cheng Z, Wang D, Tian X, et al. Capture and Ligation Probe-PCR (CLIP-PCR) for Molecular Screening, with Application to Active Malaria Surveillance for Elimination. *Clin Chem*. 2015;61(6):821-828. doi:10.1373/clinchem.2014.237115
139. Mens PF, van Amerongen A, Sawa P, Kager PA, Schallig HDFH. Molecular diagnosis of malaria in the field: development of a novel 1-step nucleic acid lateral flow immunoassay for the detection of all 4 human *Plasmodium* spp. and its evaluation in Mbita, Kenya. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008;61(4):421-427. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2008.03.009
140. Roth JM, Bes L de, Sawa P, et al. *Plasmodium* Detection and Differentiation by Direct-on-Blood PCR Nucleic Acid Lateral Flow Immunoassay: Development, Validation, and Evaluation. *J Mol Diagn*. 2018;20(1):78-86. doi:10.1016/j.jmoldx.2017.09.004

141. Antinori S, Ridolfo AL, Grande R, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the diagnosis of imported malaria: a narrative review. *Infez Med.* 2021;29(3):355-365. doi:10.53854/liim-2903-6
142. Perera RS, Ding XC, Tully F, et al. Development and clinical performance of high throughput loop-mediated isothermal amplification for detection of malaria. *PLoS ONE.* 2017;12(2):e0171126. doi:10.1371/journal.pone.0171126
143. Schneider P, Schoone G, Schallig H, et al. Quantification of *Plasmodium falciparum* gametocytes in differential stages of development by quantitative nucleic acid sequence-based amplification. *Mol Biochem Parasitol.* 2004;137(1):35-41. doi:10.1016/j.molbiopara.2004.03.018
144. Lee RA, Puig HD, Nguyen PQ, et al. Ultrasensitive CRISPR-based diagnostic for field-applicable detection of *Plasmodium* species in symptomatic and asymptomatic malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(41):25722-25731. doi:10.1073/pnas.2010196117
145. Ospina-Villa JD, López-Camarillo C, Castañón-Sánchez CA, Soto-Sánchez J, Ramírez-Moreno E, Marchat LA. Advances on Aptamers against Protozoan Parasites. *Genes.* 2018;9(12):584. doi:10.3390/genes9120584
146. Ruscito A, DeRosa MC. Small-Molecule Binding Aptamers: Selection Strategies, Characterization, and Applications. *Front Chem.* 2016;4. Accessed July 8, 2023. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2016.00014>
147. Cheung YW, Kwok J, Law AWL, Watt RM, Kotaka M, Tanner JA. Structural basis for discriminatory recognition of *Plasmodium* lactate dehydrogenase by a DNA aptamer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(40):15967-15972. doi:10.1073/pnas.1309538110
148. Liu DX, Tien TTT, Bao DT, Linh NTP, Park H, Yeo SJ. A Novel Peptide Aptamer to Detect *Plasmodium falciparum* Lactate Dehydrogenase. *J Biomed Nanotechnol.* 2019;15(1):204-211. doi:10.1166/jbn.2019.2667
149. Lee S, Song KM, Jeon W, Jo H, Shim YB, Ban C. A highly sensitive aptasensor towards *Plasmodium* lactate dehydrogenase for the diagnosis of malaria. *Biosens Bioelectron.* 2012;35(1):291-296. doi:10.1016/j.bios.2012.03.003



150. Barfod A, Persson T, Lindh J. In vitro selection of RNA aptamers against a conserved region of the *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1. *Parasitol Res.* 2009;105(6):1557-1566. doi:10.1007/s00436-009-1583-x
151. Singh NK, Thungon PD, Estrela P, Goswami P. Development of an aptamer-based field effect transistor biosensor for quantitative detection of *Plasmodium falciparum* glutamate dehydrogenase in serum samples. *Biosens Bioelectron.* 2019;123:30-35. doi:10.1016/j.bios.2018.09.085
152. Lo Y, Cheung YW, Wang L, et al. An electrochemical aptamer-based biosensor targeting *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein II for malaria diagnosis. *Biosens Bioelectron.* 2021;192:113472. doi:10.1016/j.bios.2021.113472
153. Drug Approval Package: Macugen (Pegaptanib Sodium) NDA #021756. Accessed July 8, 2023. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2004/21-756\\_Macugen.cfm](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2004/21-756_Macugen.cfm)
154. Niles JC, DeRisi JL, Marletta MA. Inhibiting *Plasmodium falciparum* growth and heme detoxification pathway using heme-binding DNA aptamers. *Proc Natl Acad Sci.* 2009;106(32):13266-13271. doi:10.1073/pnas.0906370106

## Životopis

Viktor Bekić rođen je 05.12.1998. u Zagrebu. Pohađao je Gimnaziju Tituša Brezovačkog i glazbenu školu Rudolfa Matza. Upisuje Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu 2017. godine s predviđenim završetkom studija u rujnu 2023.

Bio je demonstrator na katedri za Anatomiju. Član je studentske sekcije za gastroenterologiju i hepatologiju s kojom je sudjelovao u organizaciji multidisciplinarnog simpozija o infektivnim hepatitisima „*Abedeca hepatitis*“.

U kolovozu 2022. odrađuje stručnu praksu u sklopu Odjela za parazitologiju Sveučilišne bolnice u Heidelbergu (Njemačka) pod mentorstvom dr. Nicole Kilian, s kojom 2023. objavljuje pregledni rad na temu „*Novel secretory organelles of parasite origin - at the center of host-parasite interaction*“.