

**УПУТСТВО ЗА НАДЗОР, ПРЕВЕНЦИЈУ И КОНТРОЛУ МАЛАРИЈЕ,  
ПОСЕБНО У ПОПУЛАЦИЈИ МИГРАНАТА,  
НА ТЕРИТОРИЈИ РЕПУБЛИКЕ СРБИЈЕ, 2016. ГОДИНЕ**

**Увод**

Маларија је најчесталија тропска болест, са високим морбидитетом и морталитетом и следственим огромним економским и социјалним значајем. Процењује се да је у свету око 3,2 милијарде људи у ризику од оболевања од ове болести. Према подацима Светске здравствене организације у 2015. години је било 214 милиона нових случајева маларије са 438.000 смртних исхода и трансмисијом у 95 земаља.

Иако је у последњих 50 година значајно смањена географска територија захваћена маларијом, контрола је све тежа. Поновно јављање маларије је све учесталије у регионима из којих је паразит раније ерадикуван или у којима је инциденција била значајно смањена. Разлози су многобројни и укључују глобалне климатске промене, еколошке промене под утицајем човека које фаворизују одржавање и ширење популације комараца, мултирезистенцију паразитских врста, као и масовне миграције, изазване конфликтима или порастом туристичких и пословних путовања из и у маларична подручја.

Маларија је излечива болест ако се на време препозна и дијагностикује. Са аспекта спречавања поновног успостављања трансмисије, поуздана и правовремена дијагностика представља значајну карику у ланцу превенције.

**Епидемиологија маларије**

Узрочници маларије припадају роду *Plasmodium* (*P.*). Од преко 250 врста овог рода само пет је одговорно за маларију човека. Биолошки вектор плазмодијума су женке комараца рода *Anopheles* (*A.*). Познато је преко 400 врста комараца рода *Anopheles* (*A.*), али само тридесетак врста имају векторски капацитет за преношење маларије. Човек се инфицира убодом заражених женки комараца којим уносе спорозоите, инфективне облике паразита. Маларија је везана за водена станишта вектора, пре свега тропских и

субтропских региона света, где високе температуре погодују векторима и обезбеђују комплетирање развоја плазмодијума у женки комарца.

Врсте рода *Plasmodium* имају различиту географску дистрибуцију и учесталост. *P. falciparum* и *P. vivax* су најшире распрострањене врсте, *P. malariae* и *P. ovale* ређе, док је *P. knowlesi* ограничен на југоисточну (ЈИ) Азију.

*P. falciparum* широко је распрострањен у тропским и субтропским подручјима и изазива велики број клиничких случајева. Највећу преваленцију *P. falciparum* има у подсахарској Африци, Новој Гвинеји и на острву Хиспањола, док је *P. vivax* најзаступљенији у јужној и ЈИ Азији, Америци и западном Пацифику. Ове две врсте су подједнако заступљене на Индијском подконтиненту, у источној Азији и Океанији.

*P. vivax* има глобалну дистрибуцију, јер је сем тропских и субтропских подручја значајно заступљен и у умереним климатским подручјима. Дуга инкубација (и до 8–10 месеци) објашњава зашто ова врста може бити ендемска и у подручјима са дугом, хладном зимом. Процена је да годишње од маларије изазване овом врстом оболи 90–120 милиона људи. Тренутно највећа експанзија *P. vivax* маларије бележи се у Северној Кореји, са ризиком да се прошири на Кину и Јужну Кореју.

Врста *P. ovale* заступљена је у већини земаља подсахарске Африке, ЈИ Азије и Индијског подконтинента, са преваленцијом од чак 15% у руралним деловима Нигерије и Папуа Нове Гвинеје.

*P. malariae* има ниску преваленцију али глобалну дистрибуцију, која се поклапа са дистрибуцијом *P. falciparum*. Раширен је широм подсахарске Африке, ЈИ Азије, Индонезије и острва у западном Пацифику, а у Јужној Америци у подручју Амазона.

*P. knowlesi* је први пут описан 1931. код дугорепих макаки мајмуна у Сингапуру, а прве инфекције људи забележене су 1965. и 1971. године у Малезији, указујући на његов зооноски капацитет. Вулнерабилно подручје за трансмисију ове врсте проширило се из Малезије на шире подручје ЈИ Азије и поклапа се са дистрибуцијом вектора. Дистрибуција *P. knowlesi* у шумским појасевима условила је импортовање ове врсте преко туриста у западну Европу.

Интензивна пословна и туристичка комуникација са ендемским регионима, као и прилив имиграната, условљавају бројност импортованих случајева маларије, нарочито

у земљама западне Европе. Битан аспект импортоване маларије је не само број оболелих и умрлих, већ и могућност поновног уношења у земље из којих је искорењена али у којима су и даље присутни вектори.

Импортовани случајеви маларије у условима глобалног загревања обавезују на будност и превенцију. Високе температуре стварају погодне услове за преживљавање вектора и комплетирање спорогоничног циклуса у њима преузимањем гаметоцита плазмодијума. Случајеви спорадичне аутохтоне трансмисије маларије забележени су у појединим деловима Европе, нпр. у Италији, на Корзици и у Шпанији, док је у Грчкој поново успостављено епидемијско јављање. Наиме, након ерадикације 1974. године годишње је бележено по 20–50 импортованих случајева. Од 1991. почело је пријављивање ретких аутохтоних случајева, а од 2009. године успостављена је трансмисија *P. vivax* у Лаконији, подручју са доста водних канала, па је у периоду од 2009. до 2012. забележено укупно 73 случаја (2009. – 7, 2010. – 4, 2011. – 42, 2012. – 20 случајева). Локални вектори преузели су *P. vivax* гаметоците од имиграната из Пакистана и Авганистана који су обављали пољопривредне радове током лета.

У регионима света где је маларија ендемска, појединци могу имати веома ниске нивое паразитемије. Особе које живе у подручјима ендемским за маларију континуирано су изложене инфекцији, тако да након поновљених инфекција могу развити стање преимуниције које се карактерише имунским одговором способним да контролише паразитемију. Овај имунитет међутим не може да елиминише све паразите из циркулације, тако да ове особе постају асимптоматски резервоари и омогућавају заражавање вектора и одржавање трансмисије. Ако овакве особе дођу у подручја где маларије нема, представљају опасност и за успостављање трансмисије у овим регионима уколико домаћи вектори преузму гаметоците крвним оброком, као и ризик за здравствене раднике (убод контаминираном иглом), за преношења инфекције трансфузијом крви, конгенитално или трансплантацијом органа.

### **Епидемиологија маларије у Србији**

У бившој Југославији маларија је искорењена 1964. године, што је и Светска здравствена организација (СЗО) званично потврдила 1974. Од тада, у Србији се бележе само импортовани случајеви. Због присуства импортоване маларије, потенцијалних

вектора и великих водних простора у приобаљу Саве и Дунава погодних за одржавање *Anopheles* spp., СЗО је ово подручје прогласила пријемчивим за маларију.

### **Животни циклус паразита рода *Plasmodium***

Познато је преко 250 врста рода *Plasmodium* које могу паразитирати код различитих животиња, укључујући примате, глодаре, птице и гмизавце. Узрочници маларије човека су *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax*, *P. ovale*, а од недавно је и зооноотска врста *P. knowlesi*, због појава епидемија у ЈИ Азији, призната као пети изазивач маларије човека.

Животни циклус рода *Plasmodium* састоји се од сексуалне и асексуалне фазе. Сексуална фаза, оплођење и спорогонија, одвија се у вектору, женки анофеличног комарца и траје 10 до 18 дана. Женка полаже јаја на 2 до 3 дана за шта јој је неопходан крвни оброк. Након спорогоније при следећем крвном obroку женка инфицира наредног домаћина, уносећи својом саливом инфективне облике спорозоите.

Асексуална деоба, шизогонија, одвија се у организму човека и обухвата екстраеритроцитну фазу у хепатоцитима која траје 5–15 дана, и еритроцитну фазу.

Инфекција човека почиње убодом женке комарца рода *Anopheles* која инокулише спорозоите плазмодијума из своје саливе. Спорозоити 30–40 минута по инокулацији улазе у хепатоците где се деле и диференцирају у мерозоите чији број варира у зависности о врсте плазмодијума и креће се од 2000 (*P. malariae*) до 40.000 (*P. falciparum*). Прскањем хепатоцита долази до ослобађања мерозоиота у крвоток.

Животни циклуси врста рода *Plasmodium* се делимично разликују. Фаза шизогоније у еритроциту (Er) траје 48 сати код *P. vivax*, *P. falciparum* и *P. ovale*, 72 сата код *P. malariae*, а 24 сата код *P. knowlesi*. Мерозоити продрли у Ер користе хемоглобин (Hgb) домаћина за своје преживљавање. Формирају најпре младе трофозоите прстенастог облика, а потом зреле трофозоите, који се развијају у младе, а потом у зреле шизонте. Зрели шизонти испуњени мерозоитима доводе до прскања Ер, што за последицу има анемију, а ослобођени мерозоити инфицирају нове Ер.

У току асексуалне репродукције, после неколико генерација мерозоиота, поједини паразити се конвертују у сексуалне форме, мушке и женске гаметоците, чији живот

траје неколико дана. Стварање гаметоцита није обавезно, чак ни у случају када се болесник не лечи. Број гаметоцита у периферној крви није увек у сразмери са бројем асексуалних паразита. С обзиром на то да су гаметоцити одговорни за појаву и одржавање трансмисије плазмодијума, њихова бројност и способност да инфицирају комарца врло је важан фактор у епидемиологији маларије.

### **Клиничке карактеристике маларије**

Пријемчивост човека за настанак инфекције плазмодијумом и развој болести је различита. Код српасте анемије постоји отпорност на маларију, одсуство *Duffy* антигена на Ер у извесној мери штити од *P. vivax* маларије, док становници маларичних подручја стичу имунитет. У трудноћи, која је иначе праћена стањем физиолошке имуносупресије, маларија се испољава тежом клиничком сликом, анемијом мајке, могућом (конгениталном) трансплацентарном инфекцијом плода и превременим порођајем.

Клиничка слика маларије и фармаколошка ефикасност антималярика повезани су са врстом рода *Plasmodium* и комплексним животним циклусом у организму човека.

Инкубација обухвата време од убода комарца до почетка испољавања болести и варира од 7 до 30 дана, али и знатно дуже. Најкраћа инкубација, са ретким изузецима, везује се за *P. falciparum*, док *P. malariae* може имати дугу инкубацију, мерену и деценијама.

Маларични напад представља скуп пароксизама између којих се јављају краћи или дужи афебрилни интервали. Пароксизми су последица истовременог прскања великог броја Ер и ослобађања мерозоица у крв. Класичан пароксизам обухвата „хладни” стадијум (траје 15–60 минута, манифестује се осећајем хладноће, језе и дрхтавице), „врели” стадијум (траје два до три сата, манифестује се скоком температуре и преко 40° С, главобољом, повраћањем), и стадијум знојења, када се профузним знојењем температура нагло враћа на нормалу. Следи општа малаксалост и потреба за сном након чега се оболели осећа добро.

Симптоми су последица ослобођених паразитских токсина који индукују макрофаге на продукцију цитокина. Симптоматологија маларије је на почетку инфекције неспецифична и уобичајено се испољава симптомима сличним инфлуенци што отежава

клиничко препознавање. У почетку руптура инфицираних Ер није синхронизована, али се после неколико дана успоставља синхронизација што се манифестује интермитентном фебрилношћу на 24, 48 или 72 сата, зависно од врсте. *P. vivax* и *P. ovale* паразитирају само у младим Ер, чије је учешће у популацији Ер 2%, те је теоријски максимум нивоа паразитемије 2%. *P. malariae* паразитира у старим Ер којих има 1–2% те је и код ове врсте максимални ниво паразитемије 2%, али најчешће испод тога, уобичајено до 5000 паразита/ $\mu\text{L}$  (пар/ $\mu\text{L}$ ) крви. Најмалигнија врста, *P. falciparum*, паразитира у свим стадијумима Ер, те паразитемија може достићи и до 40–50%. Циклус асексуалног умножавања *P. knowlesi* траје свега 24 сата што за последицу има високу паразитемију.

Највећи број случајева маларије се класификује као умерена или некомплицована маларија. Међутим, маларија може довести до анемије, спленомегалије, тромбоцитопеније, благе жутице, увећане јетре, убрзаног дисања али и тежих компликација и смртог исхода.

Ако се појаве симптоми мултиорганског оштећења, уз паразитемију преко 5%, маларија се сматра тешком. Ово се посебно често дешава код *P. falciparum* маларије, где у кратком периоду може доћи до озбиљних оштећења органа када се развијају церебрална маларија и кома, акутно оштећење бубрега, едем плућа, акутни респираторни дистрес синдром (АРДС), жутица, дијареја, кардиоваскуларни колапс и шок, тешка анемија, хемоглобинурија, метаболичка ацидоза и абнормална коагулација /тромбоцитопенија. *P. falciparum* је одговоран за већину смртних случајева. Код ове врсте шизогонија се одвија у крвним судовима унутрашњих органа. Висока паразитемија може довести до тешке анемије. На површини Ер инфицираних овом врстом стварају се „испупчења”, која чине протеини богати хистидином, којима се Ер везују за васкуларни ендотел и за друге Ер. Груписане ћелије доводе до адхеренције Ер за ендотелне ћелије што изазива поремећај микроциркулације, узрокујући микротромбозе, а потом и некрозе, доводећи до оштећења мозга (церебрална маларија), бубрега и других органа.

Иако *P. vivax* ретко даје компликације, оне се могу јавити (АРДС, руптура слезине, церебрална маларија) и завршити фатално, што уз могућност релапса и пораста резистенције на главне антималярике ову врсту чини врло актуелном.

*P. ovale* ретко изазива озбиљне компликације у виду руптуре слезине, тешке анемије и АРДС-а.

Клиничке манифестације изазване врстом *P. knowlesi*, који може достићи високу паразитемију и до 27%, варирају од умерених до тешких, а болест се може завршити спонтаним излечењем, али и фатално. Код фебрилних повратника из шумских појасева ЈИ Азије клиничка сумња на *P. knowlesi* поставља се на основу теже клиничке слике и више паразитемије него што се очекује код *P. malariae*, температурних скокова на 24 сата и присуством атипичних облика плазмодијума.

С друге стране, иако су случајеви *P. vivax* и *P. ovale* маларије уопштено говорећи бенигнији, обе ове врсте плазмодијума могу у хепатоцитима формирати успаване форме, тзв. хипнозоите, који осим примарне инфекције (обично унутар 2–3 месеца од инфекције) могу и месецима или годинама касније довести до рецидива (поновне појаве болести). Ова врста рецидива означава се као релапс и представља епизоду инфекције која настаје после проласка комплетне еритроцитне фазе, уласком у циркулацију дотад успаваних паразита прееритроцитне фазе. Новија истраживања показала су да *P. ovale* даје релапсе чешће него што се раније мислило, и то у периоду између 2 месеца и 2 године након иницијалне инфекције. Хипнозоити се не налазе у развоју *P. falciparum* и *P. malariae*. Међутим, код *P. falciparum* инфекције, могући су такође рецидиви који се означавају као рекрудесценције, које представљају погоршање симптома код болесника код којих је у крви заостао низак ниво паразита, што клинички и паразитолошки није било уочљиво. За *P. malariae* карактеристично је да субмикроскопска инфекција може перзистирати деценијама.

Међу хематолошко-биохемијским параметрима најзначајнији индикатор маларије је тромбоцитопенија која се детектује код близу половине оболелих. Значајан податак је и пораст лактат дехидрогеназе (LDH), док је број Ер на почетку инфекције непромењен.

### **Лабораторијска дијагностика маларије**

Брза и поуздана дијагноза су кључне речи за сваки суспектан случај маларије. Рана дијагноза је основ успешне терапије и превенције тешких компликација. Тачно одређивање врста *Plasmodium*-а чини основу за примену одговарајуће терапије. Код

маларије, нарочито изазване *P. falciparum*-ом, значајно је одређивање и праћење нивоа паразитемије као индикатора тежине болести и успешности примењене терапије.

Циљ свих дијагностичких метода је детекција паразита у периферној крви. Њихова успешност зависи од врсте плазмодијума, нивоа паразитемије, хемиофилактике, започете терапије, присуства гаметоцита, имунитета домаћина, као и квалитета тестова. Дијагностика маларије укључује микроскопију, брзе дијагностичке тестове (*rapid diagnostic test* – RDT), серологију и молекуларне методе засноване на реакцији ланчане полимеризације (*polymerase chain reaction* – PCR).

До недавно, микроскопија је била једино доступна метода. Иако представља златни стандард у дијагностици маларије, има и бројне недостатке. Пре свега, захтева искусног паразитолога. Осим техничких ограничења, различити чиниоци као што су ниска паразитемија, мешане инфекције са доминацијом једне врсте, асимптоматске инфекције имунизоване популације са ниском паразитемијом и већ започето лечење или субдозирање лекова, могу отежати микроскопску дијагностику. Стога се ради поузданије дијагностике последњих година интензивно развијају и унапређују брзи тестови и молекуларне методе.

## 1. Микроскопија

Техника микроскопског прегледа размаза периферне крви и даље представља златни стандард у дијагностици маларије. То је релативно брза и јефтина метода, чија осетљивост и специфичност зависе од квалитета узорка и бојења и вештине паразитолога. Праг осетљивости микроскопског прегледа је 50–500 (просечно 100), а у најбољим светским лабораторијама и само 5–20 пар/ $\mu\text{L}$  крви. Потребно је прегледати 200–500 видних поља пре него што се узорак прогласи негативним. Недостаци микроскопије су објективна недетектабилност ниских паразитемија (субмикроскопска маларија – СММ), непоуздано одређивање врсте (морфолошка сличност појединих врста и стадијума паразита, варијације унутар врста, измењена морфологија паразита након започете терапије, лош квалитет размаза и/или бојења), тешко уочавање мање заступљене врсте у мешаним инфекцијама, недетектабилна паразитемија услед секвестрације *P. falciparum*, као и лажна позитивност након терапије (микроскопски видљиви, али оштећени паразити). Још од раније познато је да се бојењем густих капи



у току испирања изгуби 60–90% паразита, што је посебан проблем код ниских паразитемија.

Паразити маларије визуелизују се микроскопским прегледом бојених густих капи и крвних размаза. Бојење препарата врши се различитим техникама бојења, а време бојења зависи од боје – за бојење по Гимзи 20 до 30 минута. Микроскопским прегледом се одређују врста рода *Plasmodium*, стадијум паразита и ниво паразитемије, што су значајни параметри у избору терапије. Врста се одређује на основу величине и облика паразитираних Ер и морфологије плазмодијума. Микроскопским прегледом се може уочити паразитски пигмент фагоцитован од стране леукоцита (Le) и тиме проценити тежина болести. Препарати се могу годинама чувати што омогућава каснију контролу, као и едукацију кадрова.

Микроскопија је још увек метода избора код акутне маларије. Дужина микроскопирања зависи од нивоа паразитемије и искуства паразитолога. Код ниске паразитемије (< 100 пар/  $\mu\text{L}$  крви) неопходна је дужа микроскопија, у трајању од бар 10–15 минута пре него што се препарат прогласи негативним. Метода захтева велики ангажман и стручност паразитолога и отуда је изразито субјективна.

Микроскопија појединачног узорка обухвата преглед по три густе капи и три размаза периферне крви код свих болесника суспектних на маларију на пријему. Ако се маларија микроскопски потврди, испитују се узастопни узорци у циљу праћења паразитемије, тј. ефеката примењене терапије. Код болесника код којих се при првом микроскопском прегледу не уоче плазмодијуми, микроскопски преглед се понавља још најмање два пута пре искључивања дијагнозе маларије.

Ниска паразитемија се очекује на почетку инфекције, код болесника који су користили хемиопрофилактику, као и код становништва ендемских подручја. Одређивање паразитемије је субјективан поступак и који год метод да се изабере могуће су грешке, које могу бити системске или случајне. Системске грешке су грешке техничког особља и огледају се у виду превише или неадекватно нанете крви на плочицу, лоше начињеног крвног размаза када су паразити неравномерно размештени у претанком размазу, или заклоњени и тешко уочљиви у дебелом крвном размазу, или лошег бојења. Такође, различити паразитолози имају различите индивидуалне способности за прецизно уочавање и бројање присутних паразита. Грешке су најчешће код ниских

густина паразита, близу границе детекције. Отуда до грешака најчешће и долази на почетку и на крају праћења паразитемије, када је она и најнижа.

### **Узорковање, бојење и микроскопија густих капи и размаза периферне крви**

#### **а) Припрема предметних стакала**

Пре употребе предметна стакла за прављење густих капи и крвних размаза се обезмашћују потапањем у хром сумпорну киселину током 24 h, а по испирању водом и након сушења, стакалца се кратко потапају у 70% алкохол, након чега се појединачно посуше и гланцају чистом памучном крпом.

#### **б) Прављење густих капи и размаза периферне крви**

При узорковању се обавезно ношене заштитне рукавице за једнократну употребу и маска за лице. Јагодица домалог или средњег прста се дезинфикује тупфером вате натопљеним 70% алкохолом. Прва кап, након убода ланцетом, одстрањује се сувим делом тупфера вате, да би се одстранио преостали алкохол. Прави се пет густих капи и пет размаза периферне крви. Густе капи се праве наношењем две до три капи крви на средину плочице. Углом друге плочице крв се шири у хомогену, овалну мрљу (око 1 x 2 cm) одговарајуће густине да не би „спала” у поступку бојења и испирања. Крвни размази се праве наношењем мале капи крви на терминални део плочице. Затим се другом плочицом, под углом од 45°, кап крви развлачи наглим покретом, тако да крвни размази буду што тањи, тј. да у што већем делу размаза Ер буду поређани један до другог, а не преклопљени. Густе капи и крвни размази се потом суше на собној температури најмање 30 минута, оптимално 1 h, при чему се води рачуна да буду заштићени од комараца. По три густе капи и три крвна размаза се боје, док по два узорка служе као резервни узорци у случају неуспелог бојења или код дијагностичких дилема.

#### **в) Бојење густих капи и крвних размаза по Гимзи**

Густе капи се не фиксирају да би дошло до хемолизе Ер и ослобађања паразита, док се крвни размази фиксирају метил алкохолом да не би дошло до хемолизе. Након тога се размази и густе капи боје 10% радним раствором Гимзе. Свака плочица се прелије са 5 mL радног раствора Гимзе. После 30 минута боја се лагано одлије, а

препарати пажљиво испирају под слабиим млазом текуће воде. Потом се у вертикалном положају суше на собној температури.

#### г) Микроскопија густих капи и крвних размаза

Микроскопија обојених препарата се врши на увеличању  $\times 1000$  (у имерзионом систему микроскопирања). Прво се обавља преглед густих капи да се уочи евентуално присуство плазмодијума, а потом се обавезно, независно од резултата микроскопије густих капи, прегледају и размази периферне крви. Узорци су проглашавају негативним након најмање 30 минута микроскопирања, односно прегледом  $\geq 500$  видних поља. Уколико постоје дијагностичке дилеме (артефакти који личе на плазмодијуме, започета терапија антималярицима која је условила редукацију броја и/или измењена морфологија плазмодијума) боје се и микроскопирају и резервни препарати.

Врста плазмодијума одређује се прегледом размаза периферне крви на основу морфологије различитих стадијума паразита и морфологије паразитираних Ер (46,47).

Сем врсте, евидентрају се и уочени стадијуми паразита, присуство полураспаднутих паразита, као и присуство паразитског пигмента у Ле. Врши се и семиквантификација гаметоцита скоровањем и то тако да се налаз 1–10 гаметоцита у 100 видних поља скорује као ретки гаметоцити (+), налаз 11–100 паразита у 100 видних поља као умерено присутни (++) , а уколико је у једном видном пољу уочено  $> 1$  гаметоцита налаз се скорује као бројни гаметоцити (+++).

#### д) Одређивање паразитемије плазмодијума

Паразитемија се изражава као проценат (%) Ер паразитираних асексуалним стадијумима *Plasmodium*-а, што је рутински метод за неендемска подручја. У 10 видних поља размаза периферне крви под имерзијом броје се паразитирани Ер (независно од броја паразита у једном Ер) и укупан број Ер. Паразитемија се израчунава према формули:  $\% (P) = N/M \times 100$  (P – паразитемија, N – средња вредност броја паразитираних Ер и M – средњи број Ер у видном пољу).

## 2. Брзи антигенски тестови

У циљу елиминисања недостатака микроскопије СЗО промовише примену брзих тестова. Брзи тестови су имунохроматографски тестови којима се детектују паразитски антигени у крви. Предност је брзо добијање резултата (15–20 минута), једноставност извођења и читавања. Као циљни антигени користе се хистидином обogaћени протеин 2 (HRP2) специфичан за *P. falciparum*, панспецифична *Plasmodium* алдолаза заједничка за све четири главне врсте плазмодијума и паразитска лактат дехидрогеназа (pLDH) која може бити панспецифична, заједничка за све четири врсте или специфична за поједине врсте рода *Plasmodium*. pLDH луче само вијабилни плазмодијуми, што је корисно за праћење ефикасности терапије. Недостаци брзих тестова су висок праг осетљивости од 50 пар/ $\mu$ L, ограничена детекција мешаних инфекција, немогућност одређивања паразитемије и дуготрајно присуство HRP2 антигена у крви што онемогућава праћење ефикасности терапије. Постоје бројни брзи тестови, а СЗО прати њихове перформансе и објављује резултате анализа.

## 3. Серологија

Индиректан приступ у откривању инфекције заснива се на детекцији специфичних антитела плазмодијума серолошким методама којима се може пратити изложеност паразитима маларије и потврдити ранија инфекција. Са мањим или већим успехом у примени су тест индиректне имунофлуоресценције (ИФ), тест индиректне хемаглутинације (ИНА) и имуно-ензимске методе (*enzyme linked immunosorbent assay* – ELISA), којима се доказују специфична IgG антитела. Отуда серолошке методе не служе за детекцију акутне инфекције, јер се антитела развијају тек након 10–14 дана, али су веома корисне у епидемиолошким истраживањима, као и у трансфузиологији, за скрининг давалаца крви.

## 4. Молекуларна дијагностика маларије

Деведесетих година прошлог века започето је увођење молекуларних метода заснованих на PCR-у за детекцију специфичних секвенци ДНК плазмодијума из пуне крви. Ове методе су високо специфичне и осетљиве, јер омогућују детекцију 1–5

паразита на  $\mu\text{L}$  крви, као и генотипизацију. Квалитативним PCR-ом је повећана осетљивост у односу на микроскопски преглед и до 100 пута, док је даљим развојем уведена и квантитативна дијагностика, а унапређени су и идентификација врста рода *Plasmodium* и детекција мешаних инфекција.

Значајан напредак у развоју метода заснованих на PCR-у представљало је увођење квантитативног PCR-а у реалном времену тј. qPCR (*quantitative real-time polymerase chain reaction*). qPCR даје информације о количини ДНК присутној у узорку. У дијагностици маларије, qPCR се примењује и као скрининг тест за детекцију рода *Plasmodium*, и као специјес-специфични qPCR за детекцију врста рода *Plasmodium*. Предност PCR техника у дијагностици маларије је могућност детекције ниске паразитемије.

Висока осетљивост PCR-а помаже и код пацијената који су започели терапију пре дијагностике, те су паразити морфолошки измењени или врло ретки, као и у откривању *P. falciparum* при секвестрацији, када се мали број паразита ослобађа у циркулацију. Молекуларним методама је посебно унапређена дијагностика мешаних инфекција, што је врло битно, јер изостанак детекције мање заступљене врсте може значајно утицати на ток болести, нарочито ако је то *P. falciparum*. Применом PCR-а се превазилази проблем морфолошке сличности *P. vivax* и *P. ovale* која доводи до честе замене ових врста микроскопским прегледом. Коначно, молекуларна дијагностика је практично једини начин да се потенцијално фатална *P. knowlesi* маларија диференцира од осталих врста. Сем клиничке примене, PCR методе су нашле место и у епидемиологији, у истраживањима вакцина и нових антималярика. У клиничкој дијагностици и референтним лабораторијама qPCR је метода избора, нарочито у развијеним земљама где се оптимизују бројни протоколи. За свега неколико година од увођења PCR технологије у детекцију маларије извршена су бројна истраживања којима се различитим qPCR протоколима покушава унапредити специфичност и осетљивост у детекцији и одређивању врсте плазмодијума.

Ограничења PCR метода представљају ризик од контаминације, нарочито у лабораторијама у којима се ова дијагностика врши свакодневно, као и захтев за скупом опремом и реагенсима и посебним лабораторијским условима, који углавном недостају у ендемским подручјима. Молекуларна дијагностика се међутим интензивно уводи у неендемска подручја за дијагностику импортоване маларије, посебно у лабораторије

где се маларија ретко дијагностикује те паразитолози ређе имају прилике за стицање искуства.

Недостаци конвенционалне дијагностике, илустровани случајевима СММ, захтевају увођење молекуларне дијагностике у рутинску праксу да би се повећала дијагностичка осетљивост код пацијената са ниском паразитемијом, тачно одредила врста, и у складу с тим применила терапија, као и да би се у асимптоматској категорији путника препознали носиоци ретких *Plasmodium* spp. у циљу превенције поновног успостављања трансмисије. Данас је *state-of-the-art* метода у овом смислу qPCR, и то и за постављање дијагнозе и за потврду дијагнозе до нивоа врсте, али још увек недостају валидне клиничке студије о употребљивости и корисности у праћењу ефекта терапије.

У циљу унапређења дијагностике маларије у нашој земљи спроведена је кохортна студија која је обухватила све путнике који су се у периоду од јула 2010. до маја 2013. године након повратка из подручја ендемских за маларију јавили на Клинику за инфективне и тропске болести ради искључивања ове инфекције, а код којих је дијагноза маларије потврђена или искључена упоредном применом референтних метода конвенционалне дијагностике маларије и ново уведених метода молекуларне дијагностике. Конвенционална дијагностика маларије обављана је на Одсеку за паразитологију Службе за микробиологију КЦС, а молекуларна дијагностика у Лабораторији за медицинску паразитологију Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду, и то:

- а) Квантитативни *real-time PCR* за детекцију рода *Plasmodium* (скрининг qPCR)
- б) Квантитативни *real-time PCR* за детекцију врста рода *Plasmodium* (специјес-специфични qPCR).

### **Поступак са оболелим, контактима и непосредном околином**

**Пријава** оболевања од маларије врши се према Закону о заштити становништва од заразних болести („Сл. гласник РС”, бр. 15/2016) и Правилнику о пријављивању заразних болести и других случајева утврђених Законом о заштити становништва од заразних болести („Сл. гласник РС”, бр. 98/05).

Лекар надлежног дома здравља који је дежуран у ТПЦ-у дијагностикује и региструје сумње/обољење од маларије и уписује га у **Протокол регистрованих стања** који се налази у ТПЦ-у и обавештава надлежни завод за јавно здравље о постојању сумње на маларију и упућује особу у најближе одељење за инфективне болести здравствене установе. Податке из поменутог Протокола прикупљају чланови „Тима за надзор популације миграната” надлежног И/ЗЈЗ једном недељно. Чланови Тима за надзор популације миграната надлежног И/ЗЈЗ припремају извештај о Регистрованим стањима у складу са обрасцем Извештаја о броју, врсти пружених здравствених услуга и предузетим мерама у здравственим установама према мигрантима, тражиоцима азила и азилантима.

Подаци се у здравственим установама, и центрима за азиле уносе у предефинисане *word* обрасце и након истека посматраног периода (недеље) достављају надлежном заводу/институту за јавно здравље у електронском формату са обележеним називом здравствене установе, прихватног центра и центра за азил и датумом. Надлежни завод/институт је у обавези да унесе податке из прикупљених образаца у апликацију за унос података за коју ћемо вам приступне податке и упутство за коришћење благовремено доставити. Рок за унос података у заводу/институту за претходну недељу је понедељак у 14:00 часова.

Лекар (инфектолог) који на основу клиничке слике поставља сумњу на оболевање од маларије у координацији са територијално надлежним ЗЈЗ/ИЈЗ шаље узорак на лабораторијско испитивање. Истовремено територијално надлежном ЗЈЗ/ИЈЗ доставља појединачну пријаву сумње на оболевање од маларије. Лабораторија резултате лабораторијске анализе доставља лекару који је упутио узорак, територијално надлежном ЗЈЗ/ИЈЗ и ИЈЗ Србије.

По добијању појединачне пријаве сумње, епидемиолог територијално надлежног ЗЈЗ/ИЈЗ спроводи епидемиолошко испитивање и истраживање ради утврђивања фактора који су допринели настанку заразне болести и/или њеном преношењу и писану Информацију доставља ИЈЗ електронским путем на адресу: [epid.nadzor@batut.org.rs](mailto:epid.nadzor@batut.org.rs).

Коначно постављена дијагноза оболевања од маларије пријављује се подношењем појединачне пријаве на обрасцу бр. 1 у складу са Правилником о пријављивању заразних болести и других случајева утврђених Законом о заштити становништва од заразних болести, („Сл. гласник РС”, бр. 98/05).

Сумње/инфекције која се региструју код избеглица/миграната који су измакли епидемиолошком надзору у ТПЦ-у, а евидентирани су у служби опште медицине, служби заштите здравља школске деце и омладине, хитној помоћи или службама и установама које су територијално дислоциране као, амбуланте, или здравствене станице у селима и деловима града или амбулантама на територији надлежних И/ЗЈЗ такође се приказују кроз недељни Извештај који припрема надлежни И/ЗЈЗ.

ИЈЗ Србије припрема недељне извештаје и доставља их Министарству здравља и надлежним И/ЗЈЗ.

**Изолација.** Код хоспитализованих болесника мере предострожности које се спроводе са крвљу. Од сутона до зоре оболели морају бити окружени мрежом против комараца.

**Дезинсекција у току болести.** Не.

**Карантин.** Не

**Имунизација контаката.** Не

**Испитивање – тражење контаката и извора инфекције.** Утврдити историју претходне инфекције или могуће експозиције. Уколико се у анамнези утврди заједничко коришћење игала, извршити испитивање, активно тражење лица која су их користила и предузети њихово лечење.

**Противепидемијске мере**

Утврдити природу и величину епидемије. Интензивно активно откривање оболелих и мере сузбијања комараца, одраслих и њихових ларви, елиминација станишта комараца, лечење акутно оболелих. Коришћење личних заштитних средстава и супресивних лекова. Размотрити потребу масовног лечења.



## ДЕФИНИЦИЈА СЛУЧАЈА МАЛАРИЈЕ (*Plasmodium spp.*)

### Клинички критеријуми

Свака особа са грозницом или историјом болести да је имала грозницу.

### Лабораторијски критеријуми

Најмање један од три наведена:

- Детекција паразита маларије светлосним микроскопом у крвном размазу
- Откривање нуклеинске киселине *Plasmodium*-а у крви
- Детекција *Plasmodium* антигена

Извршити диференцијацију *Plasmodium spp.* ако је то могуће

### Епидемиолошки критеријуми

Н. П. (не примењује се)

### Класификација случаја

А. Могући Н. П.

Б. Вероватан Н. П.

Ц. Потврђени случај (свако лице које испуњава клиничке и лабораторијске критеријуме).

Референце:

1. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>
2. Zorica Dakić, doktorska disertacija: Značaj molekularne dijagnostike u evaluaciji kliničkog toka i ishoda malarije, 2015.UDK broj: 577.21:616.936-078(043.3)  
<https://fedorabg.bg.ac.rs/fedora/get/o:10953/bdef:Content/get>
3. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2012:262:0001:0057:EN:PDF>

**Упутство сачинили:**

Институт за јавно здравље Србије „Др Милан Јовановић Батут”

Центар за контролу и превенцију болести

Центар за микробиологију

у сарадњи са Клиником за инфективне и тропске болести Клиничког центра Србије