



ÖREBRO UNIVERSITET
INSTITUTIONEN FÖR KLINISK MEDICIN

Programmet för Biomedicinsk laboratorievetenskap 120 p
Biomedicinsk laboratorievetenskap C
Vårterminen 2006

**Utvärdering av Malaria Antigen ELISA kit för diagnostik av
malaria vid Christian Medical College and Hospital i Vellore,
Indien.**

– en jämförande studie mellan Quantitative buffy coat och enzyme-linked
immunosorbent assays (ELISA) metodik.

*Evaluation of Malaria Antigen ELISA kit for diagnosis of malaria at Christian Medical
College and Hospital in Vellore, India.*

Författare: Josefin Andersson
Handledare: Ken Jatta, Örebro Universitet
Dr Joy Mammen, CMCH

Abstract

Malaria är ett globalt hälsoproblem som orsakar många dödsfall runt om i världen varje år och nästan hälften av jordens befolkning ligger i riskzonen att drabbas av sjukdomen. I Indien drabbas mellan 2-3 miljoner människor varje år och det inträffar omkring 900 dödsfall. Malaria orsakas av *Plasmodium sp.* som är en protozoer, och det finns fyra olika arter som är patogena för människor, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. falciparum* samt *P. malariae*.

Vanliga metoder för att diagnostisera malaria är genom tunna och tjocka blodutstryk som färgas till exempel med Giemsa, Fields eller Leishmans färgningsteknik och studeras mikroskopiskt, Quantitative Buffy Coat (QBC), PCR tester, acridinorange färgning samt olika immunologiska tester för detektion av antikroppar eller antigen som till exempel enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) test och dipstick test.

Syftet med denna studie är att utvärdera om en användning av SD Bio Line Malaria Antigen ELISA kit ger en mer känslig, tillförlitlig, praktisk samt mindre kostsam diagnostikmetod för malaria hos patienter med misstänkt malariainfektion än den nuvarande guldstandardmetoden, QBC tillsammans med blodutstryk, vid Christian Medical College and Hospital i Vellore.

Patientproverna har i både ELISA testet samt QBC testet tillsammans med utstryk erhållit samma resultat vilket tyder på att SD Bio Line Malaria Antigen ELISA kitet skulle kunna vara en lika bra diagnostikmetod som QBC testet för diagnos av malaria. ELISA kitet har dock fler nackdelar, i jämförelse med QBC testet, så därför är slutsatsen att SD Bio Line Malaria Antigen ELISA kitet inte är en mer lämplig diagnostisk metod för malaria än den som används vid CMCH. Men då ELISA testet ändå ger en säker diagnos, enligt resultatet i studien, kan den vara ett lämpligt test inom något annat användningsområde.

Innehållsförteckning

Förkortningar	3
1. Bakgrund	4
1.1 Malariaparasiten	4
1.2 Symtom för malaria	6
1.3 Diagnostik	6
1.3.1 Quantitative Buffy Coat	7
1.3.2 Enzyme-linked immunosorbent assay	8
1.3.3 SD Bio Line Malaria Antigen ELISA kit	9
2. Syfte	9
3. Material och metod	10
3.1 Detektion av pLDH genom SD Bio Line Malaria Antigen ELISA kit	10
3.2 Detektion av <i>Plasmodium sp.</i> genom Quantitative Buffy Coat	10
3.3 Detektion av <i>Plasmodium sp.</i> genom tunna utstryk	11
4. Resultat	12
5. Diskussion	14
6. Omnämmande	16
7. Litteratur	17

Förkortningar

CMCH Christian Medical College and Hospital

DNA Deoxyribonucleic acid

EDTA Ethylenediaminetetraacetate

ELISA Enzyme-linked immunosorbent assay

PLDH Plasmodium lactate dehydrogenase

HRP Horseradish peroxidase

PCR Polymerase chain reaction

PNPP P-nitrophenylphosphate

QBC Quantitative Buffy Coat

1. Bakgrund

Malaria är ett globalt hälsoproblem som orsakar många dödsfall runt om i världen varje år och nästan hälften av jordens befolkning ligger i riskzonen att drabbas av sjukdomen. Mellan 300-500 miljoner människor infekteras av malariaparasiten och det inträffar över en miljon dödsfall varje år.¹ I Indien drabbas mellan 2-3 miljoner människor varje år och det inträffar omkring 900 dödsfall.^{2,3} Malaria är endemisk i Indien, det vill säga att sjukdomen på vissa platser alltid är förekommande men i ganska låg grad. I skogsbeklädda områden och i gränsområdet mellan Indien och Myanmar (Burma) är malaria som mest utbredd och dessa områden står för ungefär 80 % av alla rapporterade fall av malaria.³ Malaria orsakas av en protozoer, *Plasmodium species* (*Plasmodium sp.*) och det finns fyra olika arter som är patogena för människor, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. falciparum* samt *P. malariae*. De flesta fall av malaria i Indien orsakas av *P. vivax*, näst vanligast är *P. falciparum*. Malariafall orsakade av de två övriga arterna, *P. ovale* samt *P. malariae* förekommer mycket sällan i Indien.¹

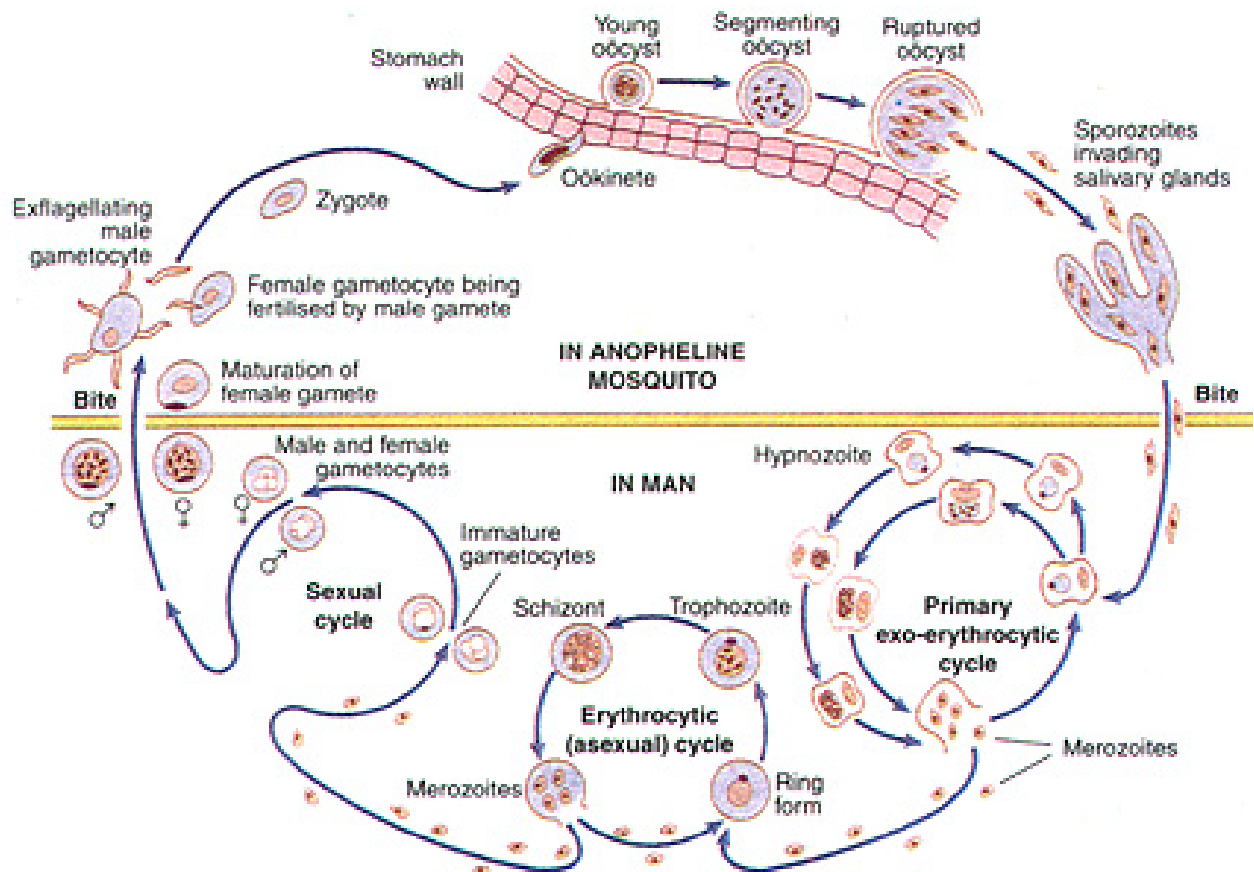
1.1 Malariaparasiten

Malaria kan överföras till människan på två olika sätt, dels genom vektorburen smitta via myggor och dels genom transfusion av smittat blod. Parasiterna överförs till människan genom bett av infekterade myggor av arten *Anopheles*, som i sin tur infekteras av blod från en smittad människa. Det är endast honor av *Anopheles*myggan som suger blod och det är därför endast dessa som kan överföra parasiterna. Det finns ungefär 300 arter av *Anopheles*myggan kända i världen, och i Indien finns ungefär 60 av dessa.¹

I *Anopheles*myggan sker den sexuella delen av parasitens livscykel, där den från människan upptagna gametocyten utvecklas till sporozoiter som sedan kan överföras till människan. Den sexuella fasen sker i myggans mage och det tar mellan 10-20 dagar för sporozoiterna att utvecklas. Dessa tar sig därefter till salivkörtlarna hos myggan och kan då sprida sig till människan där den asexuella fasen av parasitens livscykel sker, se figur 1.¹

När parasiten infekterat en människa tar den sig först till levern där den angriper levercellerna. Här utvecklas och förökas sporozoiterna innan de utvecklas till merozoiter vilket kan ta mellan 6-16 dagar beroende på vilken art av malariamygga som orsakar infektionen. Sporozoiterna som infekterar levercellerna orsakar oftast inga skador på levervävnaden och inga symptom för malaria kan därför ses i det stadiet. Merozoiterna angriper erythrocyterna och

utnyttjar de protein som finns inuti erythrocyterna för att kunna tillväxa och utvecklas. Det är speciellt hemoglobin som utnyttjas av parasiten. Merozoiternas tillväxt inuti erythrocyterna kommer till slut att leda till att cellerna lyserar och nya merozoiter släpps ut, som i sin tur infekterar nya erythrocyter.¹ Det är i detta stadiet som de typiska symtomen för malaria, feber, frössa och svettningar uppträder.⁴



Figur 1: Livscykel för *Plasmodium* sp. I Anophelesmyggan utvecklas gametocyterna till sporozoiter som sprids till människan för att där först utvecklas till merozoiter som angriper erythrocyterna och slutligen till gametocyter. (<http://www.malariasite.com/malaria/lifecycle.jpg> 060510 kl 19.00)

Inkubationstiden för malaria varierar mycket, bland annat beroende på vilken art av malariaparasiten som orsakar sjukdomen, hur stor mängd parasiter som finns i kroppen samt resistensen hos den drabbade och kan vara mellan 1 vecka upp till flera månader.¹

Plasmodium laktat dehydrogenas (pLDH) är ett enzym som produceras av alla de fyra patogena arterna av malariaparasiten.⁵ Det är ett metaboliskt enzym som katalyserar bildningen av pyruvat hos parasiten.⁶ Det är helt olik det humana laktat dehydrogenas som människan själv producerar vilket gör det möjligt att detektera enzymet i ett blodprov med antikroppar riktade mot pLDH, till exempel i ett ELISA test.¹ Enzymet produceras av

malariaparasiterna intracellulärt i erythrocyterna och för att enzymet ska kunna detekteras i ett prov måste erythrocyterna först lyseras och därmed frigöra pLDH innan antikropparna tillsätts.

1.2 Symtom för malaria

Det finns tre olika faser vid malaria, alla med olika symtom, som återkommer under sjukdomstiden. De olika faserna karaktäriseras av frossa, feber och svettningar. I det första stadiet "cold-stage" som varar mellan 15-60 minuter har den smittade hög feber med frossa och personen känner sig ofta kall och fryser. Detta stadie övergår sedan till "hot-stage" där den höga febern kvarstår men personen känner sig nu varm. Detta kan pågå i 1-8 timmar innan malarian övergår till det sista stadiet "sweating-stage". Här börjar personen svettas kraftigt tills febern börjar avklinga efter 2-4 timmar och alla symtom för malaria försvinner. Dessa symtom kommer dock att återkomma efter en viss tid då personen återigen får hög feber.^{1,7}

Andra symtom som kan uppkomma vid malaria är förstorad mjälte, huvudvärk, diarré, illamående och kräkningar. Malaria kan också ge upphov till anemi, gulsot och skador eller funktionsstörningar i andningsorgan och njurar.¹ Av de fyra arterna av malariaparasiten är det infektioner av *P. falciparum* som oftast ger de mest allvarliga symtomen och dessa infektioner orsakar också ofta dödsfall om de inte behandlas.^{1,8}

1.3 Diagnostik

Två av de vanligaste metoderna för att diagnostisera malaria är genom tunna och tjocka blodutstryk som färgas till exempel med Giemsa, Fields eller Leishmans färgningsteknik och studeras mikroskopiskt.^{5,9,10} Andra diagnostik metoder är Quantitative Buffy Coat (QBC), polymerase chain reaction (PCR) tester, acridinorange färgning samt olika immunologiska tester för detektion av antikroppar eller antigen som till exempel enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) test och "dipstick test". Tunna blodutstryk är en bra metod för att kunna identifiera vilken art av malariaparasiten som har orsakat infektionen.¹ Ett tunt utstryk skapas genom att en droppe blod placeras på ett objektglas och med hjälp av ett annat objektglas placerat i 45° vinkel mot preparatet dras droppen ut på objektglaset. Därefter kan preparaten färgas med lämplig färgningsteknik.⁷ Tjocka utstryk används oftast som screeningmetod då dessa utstryk innehåller en större mängd blod och därmed en större mängd parasiter än de tunna utstryken, vilket gör det lättare att hitta malariaparasiterna.¹ Dessa

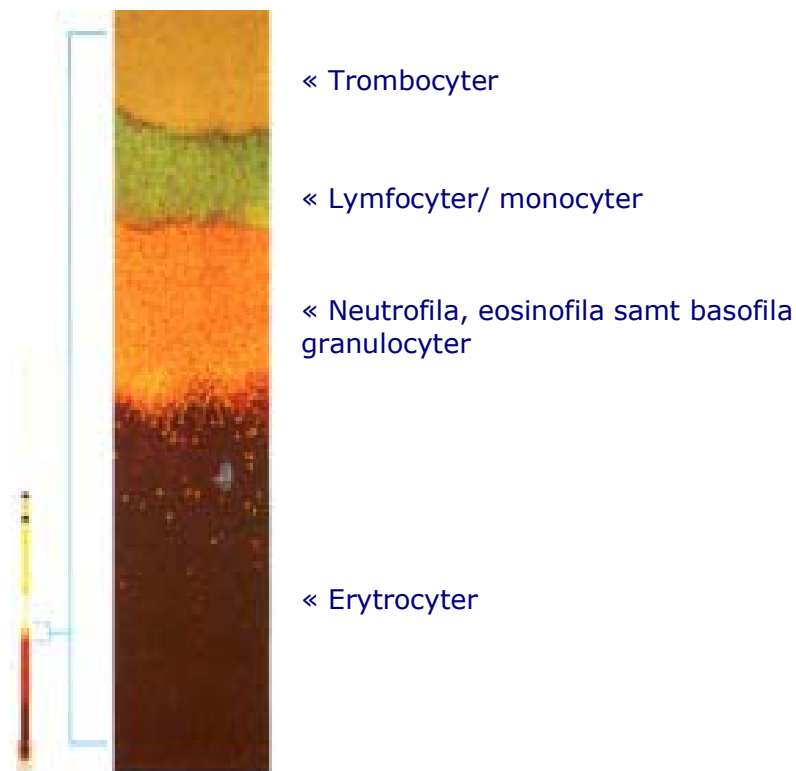
utstryk kommer ingick dock inte i denna studie, då de inte är nödvändiga för den här utvärderingen av SD Bio Line Malaria Antigen ELISA kit.

1.3.1 Quantitative Buffy Coat

Quantitative buffy coat metoden är den metod som används, tillsammans med tunna och tjocka utstryk, som guldstandard för diagnostik av malaria vid Christian Medical College and Hospital (CMCH) i Vellore, Indien. Vid en positiv diagnos av ett prov i QBC testet görs alltid, vid CMCH, tunna och tjocka utstryk av provet. Detta utförs dels för konfirmation av resultatet men även för art- samt mängdbestämning av *Plasmodium sp.* (Personlig kontakt, Dr Joy Mammen CMCH)¹¹

I QBC testet (Becton Dickinson and Company, Sparks, USA) används speciella kapillärrör innehållandes acridinorange som fylls med patientproverna och centrifugeras vid hög hastighet så att ett buffy coat lager bildas. I rören tillsätts också, innan centrifugering, ett plastflöte som pressar ut leukocyterna och de infekterade erythrocyterna mot kanterna av röret vilket gör att röret lättare går att avläsa.^{1,12} Acridinorange är ett färgämne som färgar DNA i gulgrön fluorescens. Kapillärrören avläses därför i mikroskop med UV-ljus vilket gör att acridinorange, som färgat malariaparasiternas DNA, avger fluorescens och parasiterna kan detekteras.¹

Vid centrifugeringen lägger sig de olika celltyperna i blodet i olika skikt i röret, i botten hamnar de tyngsta cellerna, erythrocyterna, därefter kommer ett tunnare lager där de infekterade erythrocyterna ligger. I detta lager kan ringstadier av malariaparasitens livscykel ses. Därefter följer granulocytlagret med neutrofila, eosinofila samt basofila celler, agranulocytlagret med lymfocyter och monocyter samt högst upp i röret trombocytlagret. I de två lagren med leukocyter ses bland annat gamet, scizont och trofocytstadier av malariaparasiten, se figur 2.¹¹



Figur 2: Kappilärrör med buffy coat lager i QBC testet. Efter centrifugering lägger sig celltyperna i olika lager i röret där de tyngsta cellerna återfinns i det nedersta lagret och de lättaste i det övre.

(<http://www.malariasite.com/malaria/QBC.htm> 060606 kl 15.00 modifierad)

1.3.2 Enzyme-linked immunosorbent assay

Det finns ett brett utbud av olika immunoassays för att kunna bestämma koncentrationen av ett specifikt ämne i en lösning.¹³ Icke-kompetativ ELISA, eller sandwich ELISA, är en av de vanligaste immunoassays. I denna immunoassay ”coatas” först en mikrotiter platta med en antikropp mot det antigenet eller den antikropp som ska detekteras i ett prov. Därefter tillsätts antigenet eller antikroppen som binder till antikroppen på den solida fasen under inkubation och allt överskott av antikroppar, de som inte bundit till den solida fasen, kan sedan tvättas bort. I nästa steg tillsätts ytterligare en antikropp märkt med ett enzym som binder till det bildade komplexet. Detta nya komplex inkuberas med en substratlösning som reagerar med enzymet vilket leder till att substratet som tidigare var färglöst omvandlas till en färgad lösning, detta färgomslag kan avläsas i en spektrofotometer vid en specifik våglängd.^{4,14} Mängden färgad lösning som bildats är direkt proportionell mot mängden antigen som finns i det prov som analyseras. Enzym som ofta används i immunoassays är horseradish peroxidase (HRP) och alkaliskt fosfat.¹⁴

1.3.3 SD Bio Line Malaria Antigen ELISA kit

Department of Clinical Pathology and Blood bank vid CMCH i Vellore önskade en utvärdering av en, för CMCH, ny diagnostikmetod för malaria, SD Bio Line Malaria Antigen ELISA kit (Standard Diagnostics Inc, Suwon, Korea). I utvärderingen tas bland annat ELISA kitets validitet; sensitivitet och specificitet, kostnad och praktiska användning upp för granskning. I ELISA kitet används en dubbel sandwich metod för att diagnostisera malaria genom att mäta förekomst och mängd av enzymet pLDH med monoklonala antikroppar.

2. Syfte

Syftet med denna studie är att utvärdera om en användning av SD Bio Line Malaria Antigen ELISA kit ger en mer känslig, tillförlitlig, praktisk samt mindre kostsam diagnostikmetod för malaria hos patienter med misstänkt malariainfektion än den nuvarande guldstandardmetoden, QBC tillsammans med blodutstryk, vid Christian Medical College and Hospital i Vellore.

3. Material och metod

3.1 Detektion av pLDH genom SD Bio Line Malaria Antigen ELISA kit

I detta test användes 24 stycken prover med helblod från olika patienter. Först gjordes en 1:100 mix av lyseringslösning (140 µl enzymkonjugat, 14 ml lyseringsbuffert). Därefter tillsattes 200 µl av lyseringslösningen till varje brunn på den ”ocoatade” mikrotiter plattan och sedan tillsattes 50 µl av respektive patientprov. Varje patientprov sattes som dubbelprov på mikrotiter plattan. Plattan placerades därefter på ett mixerbord för att blandas ordentligt och inkuberades sedan i 30 minuter i rumstemperatur för att de röda blodkropparna skulle lyseras. Efter inkubationen flyttades 100 µl av lösningarna i varje brunn på den ”ocoatade” plattan till respektive brunn på den med mus-antikroppar mot pLDH klädda plattan som sedan inkuberades, täckt med plastfilm, i 90 minuter i 37°C. Plattan tvättades därefter sex gånger med tvättlösning i en automatiserad tvättapparat för mikrotiter plattor (Wellwash 4 MK 2, Thermo Labsystems, Chennai, Indien). Plattan tvättades med 300 µl tvättlösning per brunn. Efter tvätt avlägsnades all vätska från brunnarna och därefter tillsattes 100 µl av 1:100 utspädd substratlösning (100 µl 101 x koncentrerad substratlösning, 10 ml substrat spädningslösning) till varje brunn. Plattan inkuberades ytterligare en gång, täckt med plastfilm, i 30 minuter i rumstemperatur. Efter 30 minuter tillsattes 100 µl stopplösning till varje brunn och absorbansen avlästes med en spektrofotometer (Multiskan, Thermo Labsystems, Chennai, Indien) vid 620 samt 450 nm. Ett cut off värde för detta ELISA test beräknades enligt anvisningar i manualen för SD Bio Line Malaria Antigen ELISA kitet. Cut off värdet är 0,05 adderat till medelabsorbansvärdet för de tre negativa kontrollerna.

3.2 Detektion av *Plasmodium sp.* genom Quantitative Buffy Coat

I detta test användes endast 19 av de 24 patientproverna då 5 stycken av proverna var hemolyserade och kunde därför inte analyseras med denna metod. Kapillärrören fylldes med helblod, 55-65 µl, från välblandade patientprov med etylendiamintetraacetat-lösning (EDTA-lösning). Därefter skakades kapillärrören för att blodet skulle blandas med acridinorange färgen. Ett stopp placerades i den ena änden på varje rör och i rören tillsattes ett flöte för att underlätta avläsningen. Därefter centrifugerades rören i en kapillärrörscentrifug specifik för QBC testet (QBC Centrifuge, Becton Dickinson, Sparks, USA) i fem minuter vid 12 000 rpm. Efter centrifugeringen avlästes rören i mikroskop med UV-ljus, där rören roterades för att avläsning av hela kapillärröret skulle ske.

3.3 Detektion av *Plasmodium sp.* genom tunna utstryk

På de sju patientprover som uppvisat ett positivt svar för malaria och inte var hemolyserade gjordes utstryk på objektglas. Ett tunt utstryk gjordes av varje blodprov på objektglas, märkta med respektive patients sjukhusnummer, enligt standardutförande.⁷ Preparaten fick sedan lufttorka innan de färgades med Leishmans färgningsteknik. Först flödades 10 droppar av Leishmans färgning (1,5 g Leishmans puder, 500 ml metanol) över objektglasen i två minuter. Därefter tillsattes en dubbel mängd, 20 droppar, buffertlösning med pH-värde 6,8 till varje preparat. Preparaten färgades i 15 minuter med de två lösningarna innan de placerades under rinnande kranvatten för att all överflödigt färg skulle sköljas bort. Preparaten lufttorkades sedan i tio minuter innan de monterades med DPX monteringsmedel och studerades i ljusmikroskop.

4. Resultat

Cut-off värdet för detta ELISA test beräknades till 0,130. Medelvärdet för den positiva kontrollen ligger över cut-off värdet 0,130. Patientprov 1-12 uppvisar alla positiva resultat i ELISA testet med medelvärden för dubbelproven över 0,130. I QBC testet visar prov nummer 1-7 positiva resultat. I utstryken färgade med Leishmans färgningsteknik är prov nummer 1 samt 3-6 positiva då förekomst av *Plasmodium sp.* observerats. I prov nummer 2 och 7 kan inget resultat observeras på grund av hemolys i proven, se tabell 1.

Tabell 1: Jämförelse av resultatet av de positiva proverna i ELISA testet med resultatet av QBC testet tillsammans med tunna utstryk.

Patientprov	Elisa	QBC	Leishman
	>0,130 = p	Förekomst av <i>Plasmodium sp.</i> = p	Förekomst av <i>Plasmodium sp.</i> = p
1	2,38	p	p
2	0,842	p	NA
3	1,978	p	p
4	2,168	p	p
5	2,084	p	p
6	0,516	p	p
7	0,325	p	NA
8	1,899	NA	
9	2,468	NA	
10	0,378	NA	
11	0,568	NA	
12	2,66	NA	
Positiv kontroll	3,048		

P = positiv; NA = not applicable – inget resultat erhöjts på grund av hemolys

ELISA = Enzyme-linked immunosorbent assay; QBC = Quantitative Buffy Coat

Medelvärdena för de tre negativa kontrollerna i ELISA testet ligger alla under cut-off värdet 0,130. Prov 13-24 uppvisar negativa resultat med värden under cut-off gränsen i ELISA testet. Prov 13-24 är negativa i QBC testet då ingen förekomst av *Plasmodium sp.* observerades, se tabell 2

Tabell 2: Jämförelse av resultatet av de negativa patientproverna i ELISA testet med resultatet av QBC testet.

Patientprov	Elisa	QBC
	<0,130 = n	Ingen förekomst av <i>Plasmodium sp.</i> = n
13	0,101	n
14	0,084	n
15	0,076	n
16	0,106	n
17	0,075	n
18	0,089	n
19	0,084	n
20	0,115	n
21	0,084	n
22	0,081	n
23	0,073	n
24	0,071	n
Negativ kontroll 1	0,07	
Negativ kontroll 2	0,074	
Negativ kontroll 3	0,106	

N = negativ; ELISA = Enzyme-linked immunosorbent assay; QBC = Quantitative Buffy Coat

Sensitiviteten och specificiteten för SD Bio Line Malaria Antigen ELISA kit för detektion av *Plasmodium sp.* beräknades båda till 100 %

5. Diskussion

Patientproverna har i både ELISA testet samt QBC testet tillsammans med utstryk erhållit samma resultat vilket tyder på att SD Bio Line Malaria Antigen ELISA kitet skulle kunna vara en lika bra diagnostikmetod som QBC testet för diagnos av malaria. Antalet prover i den här studien är dock troligtvis inte tillräckligt många för att en korrekt utvärdering och jämförelse mellan de olika diagnostikmetoderna ska kunna genomföras, utan skulle behöva utökas. Dessa prover var dock de som fanns att tillgå under min tid på CMCH.

Kontrollerna i ELISA testet visar korrekta värden, de positiva har ett värde över cut-off gränsen och de negativa ett värde under denna, därför kan resultatet av ELISA testet anses som tillförlitligt. I ELISA testet användes 24 stycken patientprover men i QBC testet kunde endast 19 av dessa analyseras. Orsaken till det är att fem av proverna förvarats frysta vilket hemolyserat erythrocyterna. Ett hemolyserat prov kan inte analyseras med QBC testet eftersom hela metodiken är uppbyggd på cellernas olika tyngd vid centrifugering. Inga erythrocyter, med eller utan parasiter, kommer att kunna observeras i dessa prov.

Hemolys är också orsaken till att två av patientproverna, nummer 2 samt 7, inte kunde studeras i utstryken. Preparaten var av så dålig kvalitet att en diagnos med säkerhet kunde ställas. Några utstryk av de fem patientprover som förvarats frysta gjordes inte på grund av hemolys.

Några utstryk på de patientprover som uppvisade ett negativt resultat i ELISA samt QBC testet gjordes inte då detta normalt inte görs vid ett negativt resultat vid CMCH. Om ett patientprov däremot hade uppvisat olika resultat i de två testerna hade utstryk på provet gjorts för att en slutlig diagnos skulle ha kunnat ställas.

Det största problemet med ELISA test kitet är att denna metod inte kan appliceras på diagnostik av enskilda patientprover, i motsats till QBC testet. I ELISA testet måste proverna samlas ihop och sparas till dess att tillräckligt många prover kommit in så att majoriteten av brunnarna på plattan kan fyllas. Det blir annars onödigt dyrt att utnyttja testkitet, bland annat då det för varje användningstillfälle behövs sättas negativa och positiva kontroller. Dessa kontroller säljs inte enskilt utan helt nya kit måste då köpas in när de tar slut.

Det tar dessutom lång tid att genomföra själva ELISA testet, dels på grund av långa inkubationstider och dels för att testet kräver mycket laborativt arbete. Vid diagnostik med

QBC testet kan varje enskilt patientprov analyseras direkt när det kommer in till avdelningen. Provet tar mellan 10 och 15 minuter att analysera med QBC metoden och ett negativt svar kan ges ut direkt till den ansvarige läkaren.

Vid positivt svar görs på CMCH alltid tunna och tjocka utstryk vilket gör att den slutliga diagnosen tar lite längre tid i dessa fall.¹¹ Tunna utstryk måste dock också göras vid ett positivt resultat med ELISA test kitet då detta resultat endast påvisar att patienten har en infektion av *Plasmodium sp.* och inte arttillhörigheten. De tunna utstryken krävs alltså för att kunna artbestämma parasiten även vid detta test.

Om dessa tidsaspekter läggs samman visar de på att en analys med QBC testet tar kortare tid att utföra än en analys med SD Bio Line Malaria Antigen ELISA kitet. Det är inte försvarbart att dröja med testresultatet och därigenom fördröja diagnosen och eventuellt behandling av patienten, speciellt inte vid en så allvarlig sjukdom som malaria, där läkaren behöver ett svar för att kunna behandla patienten. Ur denna aspekt är därför QBC testet en mer lämplig diagnostikmetod för malaria.

En stor nackdel med QBC testet är att det är ett test där resultatet är beroende på den som bedömer provet i mikroskopet, för en person med liten erfarenhet är det lätt att missa malariaparasiterna. Felaktiga diagnoser, både falskt positiva och falskt negativa, kan uppstå. Bland annat kan vissa strukturer i proven tolkas som malariaparasiter, som till exempel Howell-Jolly kroppar, och då leda till en felaktig diagnos initialt.^{12,15} Detta kommer dock att upptäckas i utstryken senare men bidrar ändå till en högre omkostnad, på grund av förbrukning av resurser och personal.

Kostnadsaspekten har betydelse för utvärderingen om vilken metodik som lämpar sig bäst att använda speciellt när resurserna inte är så stora.¹⁵ SD Bio Line Malaria Antigen ELISA kitet har en relativt hög inköpskostnad, priset för ett kit är 129,95 € (7500 Rs), exklusive skatt. Detta ger en kostnad för varje patientprov på 1,44 € (167 Rs) om en full platta används, det vill säga 45 prover som analyseras som dubbelprover. QBC testet har en kostnad på 0,91 € (52,6 Rs), exklusive skatt, för varje patientprov så även ur denna aspekt är QBC metoden mer lämplig att använda som diagnostik metod än SD Bio Line Malaria Antigen ELISA kitet.¹¹
(<http://www.oanda.com/convert/classic> 060518 kl 23.00)

Min bedömning, baserat på resultatet i studien, är att SD Bio Line Malaria Antigen ELISA kitet inte är en mer lämplig diagnostisk metod för malaria än den som används vid CMCH.

Testen har i denna studie givit samma korrekta diagnos på samtliga prover men då QBC testet tillsammans med utstryk har fler viktiga fördelar gentemot ELISA testet måste detta anses som den mest lämpliga att använda. Men då ELISA testet ändå ger en säker diagnos, enligt resultatet i studien, kan den vara ett lämpligt test inom något annat användningsområde.

Ett användningsområde där SD Bio Line Malaria Antigen ELISA kitet eventuellt skulle kunna användas är för att följa effekterna av behandlingen av patienter med malariainfektion, då det i studier har kunnat visas att halten av pLDH i ett prov speglar omfattningen av malariainfektion hos en patient.^{16,17}

6. Omnämmande

Jag skulle vilja tacka personalen och studenterna på Christian Medical College and Hospital för att ha tagit hand om mig på ett fantastiskt sätt under min tid på CMCH och hjälpt mig med mitt arbete, speciellt Mrs Jacobs och Mr Singh för hjälpen med ELISA testet och Mr Kumal med QBC.

Ett speciellt stort tack vill jag ge till Dr Joy Mammen, min handledare, för all hjälp med utformningen av det praktiska arbetet och för alla svar på mina otaliga frågor.

Ett stort tack vill jag också ge till Ken Jatta för all ovärderlig hjälp med den skriftliga delen av uppsatsen. Hoppas att du får din semester snart!

Tack också till alla vänner i Vellore för att ni gjorde tiden i Indien till ett oförglömligt minne.

Slutligen skulle jag också vilja tacka Katrin Forsström, my roomie & partner in crime, för all hjälp och allt stöd men framförallt för allt det roliga vi hade under vår tid i Indien. Resan hade inte varit densamma utan dig vännen!

7. Litteratur

1. Gupta B D, Maheshwari R K, Karunakaran M. *Malaria*. BI Publications Pvt Ltd. New Delhi. 2006. 9, 18-24, 25-32, 33-8, 89-116, 125-35
2. Lal S, Dhillon G P, Aggarwal C S. *Epidemiology and control of malaria*. Indian J Pediatr. 1999;66(4):547-54
3. http://w3.whosea.org/en/section10/section21/section340_4021.htm 060510 kl 15.00
4. T Parslow, D Stites, A Terr, J Imboden. *Medical Immunology*. McGraw-Hill Companies Inc. Singapore. 2003. 221-2, 673-5
5. Shindler H C, Montenegro L, Montenegro R, Carvalho A B, Abath F, Jaureguiberry G. *Development and optimization of polymerase chain reaction-based malaria diagnostic methods and their comparison with quantitative buffy coat assay*. Am J Trop Med Hyg. 2001;64(4):355-61
6. Basco L K, Marquet F, Makler M M, Le Bras J. *Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax: lactate dehydrogenase activity and its application for in vitro drug susceptibility assay*. Exp Parasitol. 1995;80(2):260-71
7. Leonard Jan B C. *Essential Malariology*. William Heinemann Medical Books Ltd. London. 1980. 35-7, 77-9
8. Nandwani S, Mathur M, Rawat S. *Evaluation of the polymerase chain reaction analysis for diagnosis of falciparum malaria in Delhi, India*. Indian J Med Microbiol 2005;23:176-178
9. Krishna B V, Deshpande A R. *Comparison between conventional and QBC methods for diagnosis of malaria*. Indian J Pathol Microbiol. 2003;46(3):517-20
10. Mendiratta D K, Bhutada K, Narang R, Narang P. *Evaluation of different methods for diagnosis of P. falciparum malaria*. Indian J Med Microbiol. 2006;24:49-51
11. Dr. Joy J Mammen, Department of Clinical Pathology and Blood Bank vid Christian Medical College and Hospital, Vellore, Indien. Email: joymammen@cmevellore.ac.in
12. Lewis S M, Bain B J, Bates I. *Practical haematology*. Harcourt Publishers Limited. Edinburgh. 2001. 537-8
13. Wilson K, Walker J. *Principles and techniques of practical biochemistry*. Cambridge University Press. Cambridge. 2000. 244
14. Nairn R, Helbert M. *Immunology for medical students*. Mosby International Ltd. Edinburgh. 2002. 32-3