

PRZYDATNOŚĆ ZESTAWU „OPTIMAL RAPID MALARIA TEST” DO SZYBKIEGO ROZPOZNAWANIA MALARII IMPORTOWANEJ DO POLSKI

PRZEMYSŁAW MYJAK¹, WACŁAW NAHORSKI², HANNA ŻARNOWSKA-PRYMEK³
I HALINA PIETKIEWICZ¹

¹Zakład Parazytologii Tropikalnej, Katedra Medycyny Tropikalnej i Parazytologii, Międzywydziałowy Instytut Medycyny Morskiej i Tropikalnej, Akademia Medyczna, Krajowy Ośrodek Medycyny Tropikalnej, ul. Powstania Styczniowego 9B, 81-519 Gdynia, E-mail: pemyjak@amg.gda.pl; ²Klinika Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych, Katedra Medycyny Tropikalnej i Parazytologii, Międzywydziałowy Instytut Medycyny Morskiej i Tropikalnej, Akademia Medyczna, Krajowy Ośrodek Medycyny Tropikalnej, ul. Powstania Styczniowego 9B, 81-519 Gdynia; ³Klinika Chorób Odzwierzęcych i Tropikalnych, Akademia Medyczna, ul. Wolska 35, 01-201 Warszawa

ABSTRACT. Usefulness of the „OptiMAL Rapid Malaria test” for rapid detection of malaria imported to Poland. In this survey the use of OptiMAL test for rapid diagnosis of malaria was evaluated. It was proved that this test allowed to diagnose the *Plasmodium* sp. antigen in 72% of examined blood specimens, 82% for *P. falciparum* infection and 69% for *P. vivax*, whereas *P. ovale* was not detected at all. The test sensitivity depended on the parasitemia level. It showed a sensitivity of 100% for parasitemia density exceeded 1%, 95.4% with the parasitemia ranging from 0.1-0.99%. For lower parasite density, the test's sensitivity was of 32 and 60%. The OptiMAL test showed a 99.1% specificity thus it revealed to be significantly high.

Key words: antigen, diagnosis, malaria, OptiMAL test, *Plasmodium*.

WSTĘP

Według danych Światowej Organizacji Zdrowia od 300 do 500 milionów ludności świata choruje corocznie na malarię, z czego około 1,5-2,7 miliona umiera (WHO 1999). W Polsce notuje się rocznie do kilkudziesięciu przypadków malarii zawlekanych do kraju oraz znacznie więcej zachorowań w trakcie pobytu w tropiku przed powrotem do Polski. Notuje się także przypadki zgonów, a śmiertelność jest ponad 10 razy wyższa niż w krajach europejskich (<http://cisid.who.dk/mal>), co spowodowane jest zazwyczaj nieprawidłową lub zbyt późno postawioną diagnozą.

Z 10 próbami uzyskanymi od osób z rozpoznaną malarią i 62 próbami od osób grupy kontrolnej test OptiMAL wykonano w Centralnym Laboratorium Analitycznym (kierownik – mgr Hanna Czeszko-Paprocka) Wojewódzkiego Szpitala Zakaźnego w Warszawie.

Jednym z podstawowych badań wykrywających pasożyta są rozmazy krwi, tzw. „rozmaz cienki” i „gruba kropla”, barwione Giemszą. Osoby z dużym doświadczeniem potrafią wykryć 10-20 pasożytów na 1 μ l krwi (WHO 1988, 1990), jednak osoba wykonująca badania poza strefą endemiczną dla malarii, jest zdolna do wykrycia parazytemii wynoszącej co najmniej 100 lub więcej zarażonych krwinek na 1 μ l krwi. Ponadto niska parazytemia może utrudniać prawidłowe rozpoznanie gatunku *Plasmodium*, zwłaszcza w przypadkach inwazji mieszanej oraz po wcześniejszym przyjęciu nieskutecznej dawki leku przeciwmalarycznego.

Badania serologiczne niewątpliwie ułatwiają rozpoznanie malarii, ale mają też i wady: przede wszystkim trudno jest odróżnić inwazję aktywną od przebytego zarażenia, albowiem swoiste przeciwciała utrzymują się przez wiele miesięcy po wyleczeniu. Trudno też jest prawidłowo zróżnicować, jakim gatunkiem zarodźca została zarażona dana osoba. Badania takie są jednak cenne w retrospektywnym potwierdzaniu malarii przebytej poza granicami kraju, zwłaszcza w przypadkach, gdy brakuje dokumentacji lekarskiej bądź laboratoryjnej (Myjak i wsp. 1993).

Duży postęp w badaniach diagnostycznych przyniosły techniki molekularne, a zwłaszcza reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR), która jest bardzo czułą i swoistą techniką (Myjak i wsp. 2002). Jednak badania te są stosunkowo drogie i jak dotąd wykonywane tylko w wyspecjalizowanych referencyjnych laboratoriach.

Wprowadzone w ostatnich latach testy immunochromatograficzne (Garcia i Brucker 2001) pozwalają na wykrycie wielu przypadków malarii poprzez wykazanie obecności swoistej dla *Plasmodium* dehydrogenazy mleczanowej (pLDH) lub antygeny HRP-2 (histidine-rich protein-2). Jednym z zestawów wykrywających pLDH jest „OptiMAL Rapid Malaria test” (OptiMAL), produkowany na licencji FLOW Inc., USA przez DiaMed AG w Szwajcarii, a rozprowadzany w Polsce przez DiaHem – POL Sp. z o.o. Test pozwala na wykrycie zarażenia *P. falciparum* oraz odróżnienie zarażenia *P. falciparum* od zarażenia innymi gatunkami z rodzaju *Plasmodium*.

Celem naszych badań było określenie przydatności zestawu OptiMAL do szybkiego wykrywania zarażenia *Plasmodium* sp. oraz oceny skuteczności leczenia malarii w warunkach ewentualnego braku dostępu do wyspecjalizowanej diagnostyki laboratoryjnej.

MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto 90 prób krwi uzyskanych od 74 pacjentów z rozpoznaną malarią (na podstawie wykrycia pasożytów lub swoistego DNA) oraz 111 prób pobranych od 104 osób po powrocie z terenów tropikalnych i subtropikalnych stanowiących grupę kontrolną. Ponadto od 5 pacjentów (3 zarażonych *P. falciparum* i 2 *P. vivax*) pobrano krew wielokrotnie podczas monitorowania skuteczności leczenia malarii.

Od każdego pacjenta, podczas rutynowych badań diagnostycznych, pobierano krew do probówki z EDTA, którą badano bezpośrednio lub zamrażano w -20°C i przechowywano do czasu wykonania badań testem OptiMAL i PCR (Myjak i wsp. 2002). W tym samym czasie sporządzano rozmazy z krwi (cienki rozmaz i gruba kropla) pobranej z palca lub z krwi z EDTA, które barwiono Giemszą. Badania przyjmowano za ujemne, jeżeli w 200 polach widzenia grubej kropli krwi nie wykryto pasożytów. Na podstawie obrazu cienkiego rozmazu krwi oznaczano stopień parazytemii.

WYNIKI I DYSKUSJA

Wśród zbadanych 90 prób krwi uzyskanych od osób chorych na malarię pozytywne wyniki w teście OptiMAL uzyskano w 65 przypadkach (72,2%). Częściej uzyskiwano wyniki dodatnie w przypadku zarażenia *P. falciparum* (82,1%) niż *P. vivax* (69,2%). Jedna próba krwi z *P. malariae* była także dodatnia, natomiast 6 prób z *P. ovale* i jedna próba z inwazją mieszaną (*P. falciparum* + *P. vivax*), dały wynik ujemny (Tabela 1). Spośród 111 prób krwi od osób z grupy kontrolnej, w 110 przypadkach test OptiMAL był ujemny, a w jednym przypadku uzyskano słabo widoczny prążek wskazujący na obecność antygenu *P. falciparum*.

Czułość testu OptiMAL zależała od stopnia parazytemii (Tabela 1). Przy parazytemii powyżej 1% wszystkie próby były dodatnie, przy parazytemii 0,99-0,1% wyniki dodatnie uzyskano w 95,4%, z czego z dwiema próbami uzyskanymi od tego samego pacjenta, zamiast *P. vivax*, test wykazał obecność antygenu *P. falciparum*. Przy niższej parazytemii czułość testu OptiMAL znacznie spadała i wynosiła 60% i 32%, odpowiednio przy parazytemii 0,099 do 0,01% i poniżej 0,01%. W przypadku zarażenia *P. falciparum* OptiMAL był zawsze dodatni już przy parazytemii większej od 0,01%. Ta różna czułość testu i jej zależność od stopnia parazytemii jest zgodna z wynikami podawanymi przez większość badaczy (Palmer i wsp. 1998; Piper i wsp. 1999; Hunt-Cooke i wsp. 1999; Iqbal i wsp. 1999, 2002, 2003; Huong i wsp. 2002).

Producent OptiMAL podaje, że test ten pozwala na wykrycie wszystkich gatunków *Plasmodium*, jednak w 6 przypadkach zarażenia *P. ovale* nie uzyskaliśmy ani jednego wyniku dodatniego. Podobne wyniki uzyskali Grobusch i wsp. (2002), którzy uważają, że czułość testów immunochromatograficznych, w tym OptiMAL, jest niska w stosunku do *P. ovale* i *P. malariae* i wynosi odpowiednio 31,2% i 47,6%. Być może ma to też związek z zazwyczaj niską parazytemią występującą przy zarażeniu tymi dwoma gatunkami *Plasmodium*.

Celem śledzenia skuteczności leczenia malarii, od 5 pacjentów, w tym 3 zarażonych *P. falciparum* i 2 *P. vivax*, krew pobrano wielokrotnie. Uzyskane wyniki (Tabela 2) wskazują, że test OptiMAL można także stosować do monitorowania skuteczności leczenia malarii. Test ten wskazuje wynik ujemny o 1-2 dni szybciej niż

Tabela 1. Porównanie wyników testu OptiMAL z badaniami mikroskopowymi i molekularnymi w kierunku *Plasmodium* spp.

Parazytemia	<i>P. falciparum</i>		<i>P. vivax</i>		<i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i>		<i>P. ovale</i>		<i>P. malariae</i>		RAZEM	
%	N	n +	N	n +	N	n +	N	n +	N	n +	N	n + % +
> 1	21	21	2	2		2					23	23 100
0,99-0,1	10	10	11	10*		10*	1	1			22	21 95,4
0,099-0,01	7	7	10	5	3	0					20	12 60,0
< 0,01	18	8	2	0	3	0					24	8 32,0
nie wykryto (PCR +)			1	1							1	1
RAZEM	56	46	26	18	6	0	1	1	1	1	90	65 72,2
Procent		82,1		69,2								72,2

N – liczba badanych prób, n + – liczba prób dodatnich, * – w tym w 2 próbach od tego samego pacjenta uzyskano wynik wskazujący na zarażenie *P. falciparum* podczas gdy w badaniu mikroskopowym i PCR rozpoznano *P. vivax*.

Tabela 2. Wyniki badań laboratoryjnych kolejnych surowic uzyskanych od tych samych pacjentów z rozpoznana malarią

Pacjent No	Czas ¹	Wynik badania:		
			PCR	OptiMAL
1	0	<i>P. falciparum</i> , pierścionki, gametocyty, parazytemia 1,78%	<i>P. falciparum</i>	<i>P. falciparum</i>
	1	<i>P. falciparum</i> , pierścionki, gametocyty, parazytemia 1,17%	<i>P. falciparum</i>	<i>P. falciparum</i>
	2	<i>P. falciparum</i> , pierścionki, gametocyty, parazytemia < 0,1%	<i>P. falciparum</i>	<i>P. falciparum</i>
	4	<i>P. falciparum</i> , pojedyncze gametocyty,	<i>P. falciparum</i>	ujemny
	7 12	ujemny ujemny	<i>P. falciparum</i> ujemny	ujemny ujemny
2	0	<i>P. falciparum</i> , pierścionki, parazytemia 2,18%	<i>P. falciparum</i>	<i>P. falciparum</i>
	1	<i>P. falciparum</i> , pierścionki, parazytemia 4,78%	<i>P. falciparum</i>	<i>P. falciparum</i>
	2	<i>P. falciparum</i> , pojedyncze pierścionki	<i>P. falciparum</i>	<i>P. falciparum</i>
	3, 4, 5 i 6	<i>P. falciparum</i> – pojedyncze gametocyty	<i>P. falciparum</i>	ujemny
	10	ujemny	<i>P. falciparum</i>	ujemny
	20 i 21	<i>P. falciparum</i> – pojedyncze gametocyty	<i>P. falciparum</i>	ujemny
	24	ujemny	<i>P. falciparum</i>	ujemny
3	0	<i>P. falciparum</i> , pierścionki, parazytemia 30%	<i>P. falciparum</i>	<i>P. falciparum</i>
	4	<i>P. falciparum</i> , pierścionki, parazytemia 4%	nie badano	<i>P. falciparum</i>
	6	<i>P. falciparum</i> , 1 gametocyt	nie badano	<i>P. falciparum</i>
	12	ujemny	nie badano	<i>P. falciparum</i>
	27	nie badano	nie badano	ujemny
4	0	<i>P. vivax</i> , pierścionki, gametocyty, parazytemia 0,2 %	<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium sp.</i>
	1	<i>P. vivax</i> , pojedyncze gametocyty	<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium sp.</i>
	2	<i>P. vivax</i> , pojedyncze gametocyty	<i>P. vivax</i>	ujemny
	3	ujemny	<i>P. vivax</i>	ujemny
	4	ujemny	<i>P. vivax</i>	ujemny
	5 i 7	ujemny	ujemny	ujemny
5	0	<i>P. vivax</i> , pierścionki, parazytemia 0,64 %	<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium sp.</i>
	1	<i>P. vivax</i> , pojedyncze gametocyty,	<i>P. vivax</i>	ujemny
	2, 3, 4 i 5	ujemny	ujemny	ujemny

¹ Dni od pierwszego pobrania i mikroskopowego badania krwi

wykazują rozmazy krwi, stąd też eradykację pasożytów z krwiobiegu można przyjąć za skuteczną, jeżeli co najmniej 2-3 kolejne badania testem OptiMAL były ujemne. W jednym przypadku okres ten był dłuższy, jednak test OptiMAL był dodatni, gdy w rozmazach krwi znajdowały się postacie wegetatywne pasożyta, a ujemny, gdy wykrywano jedynie pojedyncze gametocyty, nie mające wpływu na dalszy przebieg choroby pacjenta. To, że w przypadku występowania w krwi tylko gametocytów, test OptiMAL często nie wykazuje obecności antygeny, podają także Iqbal i wsp. (1999, 2003). Również w jednym przypadku test wskazywał na obecność antygeny *P. falciparum*, podczas gdy rozmazy krwi były już ujemne. W tym przypadku antygen mógł się utrzymywać dłużej, gdyż początkowa parazytemia wynosiła aż 30%. Na taką zależność występowania antygenemii przy jednocześnie ujemnych rozmazach krwi, uwzględniając początkową wysoką parazytemię, wskazują też Huong i wsp. (2002) oraz Iqbal i wsp. (2003).

Mimo pewnych ograniczeń (niekiedy test jest ujemny), test OptiMAL ze względu na szybkość i łatwość wykonania, może być stosowany w szpitalach, gdzie brakuje wykwalifikowanego personelu diagnostycznego, lub podczas dyżurów laboratorium gdy nie pracują odpowiedni specjaliści. Z powodzeniem może być on stosowany w tropiku na terenie pracy grup polskich specjalistów lub przez organizatorów coraz popularniejszych wycieczek turystycznych. Pozwoli to w wielu przypadkach na szybkie wykrycie malarii oraz odróżnienie zarażenia *P. falciparum* od zarażenia innymi gatunkami *Plasmodium*, a tym samym na podjęcie skutecznego leczenia. Jednak w przypadku wyniku ujemnego, przy klinicznym podejrzeniu malarii poleca się wykonać standardowe rozmazy krwi (w razie potrzeby także PCR), które powinny być zbadane w jak najszybszym czasie.

PODZIĘKOWANIA

Autorzy składają serdeczne podziękowania Pani Marii Piesik za pomoc w wykonywaniu badań immunologicznych i molekularnych oraz w opracowywaniu wyników badań. Praca została częściowo sfinansowana w ramach badań własnych W-948.

LITERATURA

- Garcia L.S., Brucker D.A. 2001. Diagnostic medical parasitology. ASM Press 4th ed.
- Grobusch M.P., Hänscheid T., Zoller T., Jelinek T., Burchard G.D. 2002. Rapid immunochromatographic malaria antigen detection unreliable for detecting *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infection Diseases* 21: 818-820.
- Hunt-Cooke A., Chiodini P.L., Doherty T., Moody A.H., Ries J., Pinder M. 1999. Comparison of a parasite lactate dehydrogenase-based immunochromatographic antigen detection assay (OptiMAL(r)) with microscopy for the detection of malaria parasites in human blood samples. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 60: 173-176.
- Huong N.M., Davis T.M.E., Hewitt S., Huong N.V., Uyen T.T., Nhan D.H., Cong L.D. 2002. Comparison of three antigen detection methods for diagnosis and therapeutic monitoring of malaria in

- a field study from southern Vietnam. *Tropical Medicine and International Health* 7: 304-308.
- Iqbal J., Sher A., Hira P.R., Al-Owaish R. 1999. Comparison of the OptiMAL test with PCR for diagnosis of malaria in immigrants. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 3644-3646.
- Iqbal J., Khalid N., Hira P.R. 2002. Comparison of two commercial assays with expert microscopy for confirmation of symptomatically diagnosed malaria. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 4675-4678.
- Iqbal J., Muneer A., Khalid N., Ahmed M.A. 2003. Performance of the OptiMAL test for malaria diagnosis among suspected malaria patients at the rural Health Centers. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 68: 624-628.
- Myjak P., Jaremin B., Zwierz C., Nahorski W., Pietkiewicz H., Kocięcka W., Stefaniak J., Żarnowska A., Niścigowska J., Płotkowiak J. 1993. Przydatność odczynu immunofluorescencji pośredniej z antygenem *Plasmodium falciparum* dla bieżącego i wstecznego rozpoznania malarii. *Polski Tygodnik Lekarski* 48: 732-736.
- Myjak P., Nahorski W., Pieniazek N.J., Pietkiewicz H. 2002. Usefulness of PCR for diagnosis of imported malaria in Poland. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 21: 215-218.
- Palmer C.J., Lindo J.F., Klaskala W.I., Quesada J.A., Kaminsky R., Baum M.K., Ager A.L. 1998. Evaluation of the OptiMAL test for rapid diagnosis of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* malaria. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 203-206.
- Piper R., Lebras J., Wentworth L., Hunt-Cooke A., Houzé S., Chiodini P., Makler M. 1999. Immunocapture diagnostic assay for malaria using *Plasmodium* lactate dehydrogenase (pLDH). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 60: 109-118.
- World Health Organization. 1988. Malaria diagnosis: memorandum from a WHO meeting. *Bulletin of the World Health Organization* 66: 575-594.
- World Health Organization. 1990. Severe and complicated malaria. Second Edition. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 84, Supplement 2: 23-25.
- World Health Organization. 1999. Malaria 1982-1997. *Weekly Epidemiological Record* 74: 265-272.

Zaakceptowano do druku 14 czerwca 2004