

INTERPRETACJA TESTÓW IMMUNOCHROMATOGRAFICZNYCH Z ANTYGENEM HRP-2 U DZIECI DO LAT 5 W REJONIE O WYSOKIM RYZYSKU TRANSMISJI ZIMNICY W PAPUA NOWEJ GWINEI

NORBERT REHLIS¹ I PHILIP JAVOR²

¹Katedra i Klinika Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych, Akademia Medyczna,
ul. Przybyszewskiego 49, Poznań; ²Provincial Health Office, Modilon Hospital P.O. Box 2115
Madang, Madang Province, Papua New Guinea

ABSTRACT. Interpretation of immunochromatographic tests with HRP-2 antigen in children under 5 years in an area of high risk of malaria transmission in Papua New Guinea. The immunochromatographic tests with HRP-2 antigen (histidine-rich protein) Vision Biotech Pf Rapid Malaria Test was performed in 291 children under 5 years presenting fever or history of fever (malaria presumptive cases) admitted to Children Out-Patient Department of the Modilon Hospital in Madang, in a high malaria risk area of Papua New Guinea. The results of the tests were compared to the results of the parasitic examination of the peripheral blood with light microscopy (thick and thin smears). The HRP-2 test showed very high sensitivity (95.4%) and specificity (94.1%) for *Plasmodium falciparum* parasitaemia and none or very low sensitivity and specificity for other malaria species. The HRP-2 test detected both asexual and sexual stages of the *Plasmodium falciparum* parasites. The test did not show significant changes in detection of different levels of parasitaemia. These findings enable to conclude that the HRP-2 immunochromatographic assay can be very helpful to diagnose *Plasmodium falciparum* malaria when microscopy examination is not available, but as qualitative tests can be difficult for interpretation especially in high malaria risk areas. Therefore it can require re-examination of blood with microscopy to confirm species and development stages of *Plasmodium* spp. and to assess parasite load.

Key words: diagnosis HRP-2, immunochromatographic test, malaria, *Plasmodium falciparum*.

WSTĘP

Malaria jest jedną z najważniejszych chorób krajów strefy tropikalnej. Jest też (obok zapaleń płuc, chorób biegunkowych, niedożywienia i odry) jedną z najczęstszych przyczyn zgonów dzieci do lat 5 (Gove 1997). W krajach o klimacie umiarkowanym, zawleczona z rejonów endemicznych może stanowić poważny problem diagnostyczny i terapeutyczny (Rehlis i wsp. 1998). Szczególnie groźna dla życia jest inwazja wywoływana przez *Plasmodium falciparum*. W wyniku sekwestracji naczyń włosowatych doprowadza ona do wielonarządowych, nieodwracalnych zmian chorobowych (MacPherson i wsp. 1985, Pongponratn i wsp. 1991). Na nie-

korzystny przebieg zachorowania na malarię wywołaną przez *P. falciparum* szczególnie narażone są dzieci oraz osoby tymczasowo przebywające w rejonach endemicznych (turyści, pracownicy sezonowi).

Podstawowym badaniem stosowanym w rozpoznawaniu zimnicy jest badanie krwi obwodowej metodą grubej kropli i cienkiego rozmazu. Badanie to nie jest jednak powszechnie dostępne ze względu na wymagane doświadczenie osób oceniających rozmazy malaryczne, znajomość procedury barwienia i konieczność stosowania wysokiej klasy mikroskopu (Payne 1988). Przyczynia się to do opóźnień w ustaleniu rozpoznania oraz włączeniu celowanego leczenia, co ma niekorzystny wpływ na przebieg choroby.

Jedną z alternatywnych metod rozpoznawania zimnicy, łatwych w wykonaniu i nie wymagających dodatkowego wyposażenia są testy immunochromatograficzne wykrywające we krwi antygen HRP-2 (histidine-rich protein) swoisty dla inwazji *P. falciparum* (Durrheim i wsp. 1998, Makler i wsp. 1998). Celem pracy była ocena wartości diagnostycznej testu z antygenem HRP-2 u pacjentów z podejrzeniem zimnicy, zamieszkujących rejony o wysokim ryzyku zachorowania na malarię.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono w Poradni Pediatrycznej Szpitala w Madang na północnym wybrzeżu Papui Nowej Gwinei, w rejonie o wysokim ryzyku zachorowania na zimnicę. Programem badań objęto grupę 291 dzieci w wieku od 2 miesięcy do 5 lat tj. 141 chłopców (48,5%) i 150 dziewczynek (51,5%), u których stwierdzono temperaturę ciała 37,5°C lub wyższą mierzoną pod pachą, lub których rodzice albo opiekunowie zgłaszali gorączkę jako przyczynę wizyty w poradni. Z badań wykluczono dzieci w bardzo ciężkim stanie klinicznym, kierowane bezpośrednio na oddział pediatryczny lub oddział intensywnej opieki medycznej oraz dzieci, które zgłosiły się do poradni w celu kontroli dotychczasowego leczenia. Warunkiem uczestnictwa w programie była zgoda rodziców lub opiekunów dzieci na przeprowadzenie badań krwi w kierunku zimnicy metodą grubej kropli i cienkiego rozmazu oraz badań z wykorzystaniem technik immunochromatograficznych. Krew włośniczkowa do badań pobierana była z palca po uprzednim zebraniu wywiadu i przeprowadzeniu badania przedmiotowego. Procedura badań została zaakceptowana przez Komisję Etyczną Uniwersytetu oraz Szpitala w Madang.

Rozmazy krwi obwodowej barwione były barwnikiem Field Stain zgodnie z procedurą opisaną w „Bench aids for the diagnosis of malaria infections” (WHO 2000). Preparaty oglądano za pomocą mikroskopu świetlnego z użyciem obiektywu immersyjnego przy powiększeniu 1000-krotnym. Jako „ujemne” kwalifikowano preparaty, w których nie stwierdzono form rozwojowych *Plasmodium* spp. w co najmniej 200 polach widzenia grubej kropli. W preparatach „dodatnich” w celu ustalenia gatunku *Plasmodium* spp. dodatkowo oceniano także cienkie rozmazy. Każdy

z preparatów oglądany był przez 2 niezależne osoby. W przypadku uzyskania różnych wyników, preparat oceniany był ponownie w celu ustalenia ostatecznego rozpoznania. Intensywność inwazji *Plasmodium* spp. określano obliczając liczbę pasożytów przypadającą na 200 krwinek białych w kolejnych polach widzenia. Następnie z wykorzystaniem wzoru: $d=(Pc/Wc)*\alpha$ obliczano liczbę zarodźców zimnicy w mikrolitrze badanej krwi (gdzie: d – intensywność inwazji, Pc – łączna liczba zarodźców w liczonych polach widzenia, Wc – łączna liczba krwinek białych w ocenianych polach widzenia, α – standartowa liczba krwinek białych w mikrolitrze krwi, przyjęta w badaniach jako 8000 WBC/mm³). U każdego dziecka wykonano także badanie z wykorzystaniem testu Vision Biotech Pf Rapid Malaria Test z antygenem HRP-2 (Vision Biotech, Cape Town, Republika Południowej Afryki). Krew włośniczkową pobierano do heparynizowanej kapilary w ilości około 5 mikrolitrów, a następnie przenoszono na pasek testowy gdzie poddana była hemolizie z użyciem 4 kropel buforu zawierającego swoiste przeciwciała znakowane złotem koloidalnym skierowane przeciwko antygenowi HRP-2. Powstałe kompleksy antygen-przeciwciało wychwytywane były przez zakotwiczone na pasku testowym przeciwciała skierowane przeciwko antygenowi HRP-2 tworząc w przypadku obecności antygeny widoczną gołym okiem barwną linię. Wynik testu odczytywany był w ciągu 15-30 minut od jego wykonania przez 2 niezależnych obserwatorów. W przypadku braku zgodności, test oceniany był ponownie. Po zakodowaniu wyników badań, uzyskane dane analizowane były z użyciem programu EPI-INFO ver. 6.4d opracowanego przez CDC w Atlancie i WHO w Genewie. Aby zminimalizować wpływ ewentualnych błędów wykorzystano metodę podwójnego wprowadzania danych. W celu interpretacji wyników testu obliczono czułość (SN), swoistość (SP), dodatnią wartość predykcyjną (PPV), ujemną wartość predykcyjną (NPV) oraz efektywność (EF) testu w odniesieniu do wyników badań parazytologicznych krwi metodą grubej kropli i cienkiego rozmazu. W obliczeniach wykorzystano standardowe formuły matematyczne: $SN=TP/(TP+FN)$; $SP=TN/(TN+FP)$; $PPV=TP/(TP+FP)$; $NPV=TN/(TN+FN)$ oraz $EF=(TP+TN)/(TP+TN+FP+FN)$, gdzie: TP – wynik prawdziwie dodatni, FP – wynik fałszywie dodatni, TN – wynik prawdziwie ujemny, FN – wynik fałszywie ujemny.

WYNIKI I DYSKUSJA

W badanej grupie obecność zarodźców zimnicy we krwi włośniczkowej stwierdzono u 111 dzieci (38,1%). U 87 dzieci (29,9%) stwierdzono obecność form rozwojowych *P. falciparum*, u 24 (8,2%) *P. vivax*, u 3 (1%) *P. malariae*, a u 1 (0,3%) *P. ovale*. U 4 dzieci (4,1%) stwierdzono obecność inwazji mieszanych: *P. falciparum* i *P. vivax* (n=2), *P. falciparum* i *P. malariae* (n=1) oraz *P. vivax* i *P. malariae* (n=1). Wyniki badań parazytologicznych krwi przedstawione zostały w Tabeli 1.

Tabela 1. Wyniki badań parazytologicznych krwi u 291 dzieci do lat 5 w Madang w Papua Nowej Gwinei w rejonie o wysokim ryzyku transmisji zimnicy

Gatunek zarodźca zimnicy	<i>P. falciparum</i> trofozoity, schizonty	<i>P. falciparum</i> gametocyty	wszystkie formy	<i>P. vivax</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. ovale</i>	Inwazje mieszane	Bez parazytemii
Występowanie n=291	25,8% n=75	4,1% n=12	29,9% n=87	8,2% n=24	1% n=3	0,3% n=1	1,4% n=4	61,8% n=180

U 20 dzieci (6,9%) stwierdzono intensywność inwazji *P. falciparum* poniżej 5000 zarodźców w mm³ (trofozoity i schizonty), natomiast parazytemię powyżej 5000 zarodźców w mm³ stwierdzono u 55 dzieci (18,9%). •

Test immunochromatograficzny Vision Biotech Pf Rapid Malaria Test wykazał obecność antygeny HRP-2 u 95 dzieci (32,6% ogółu badanych). Obliczenia czułości, swoistości, dodatniej i ujemnej wartości predykcyjnej oraz efektywności wykonanych testów w odniesieniu do badań parazytologicznych krwi metodą grubej kropli i cienkiego rozmazu przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Cechy testu Vision Biotech Pf Rapid Malaria Test z antygenem HRP-2 w odniesieniu do badań parazytologicznych krwi metodą grubej kropli i cienkiego rozmazu

Gatunek zarodźca	formy bezpłciowe	<i>P. falciparum</i>		<i>P. vivax</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. ovale</i>
		gametocyty	wszystkie formy	wszystkie formy	wszystkie formy	wszystkie formy
Czułość	94,7%	95,0%	95,4%	16,7%	66,7%	0%
	94,5%*	94,7%*	95,2%*	9,0%*	0,0%*	0%
Swoistość	88,9%	72,0%	94,1%	66,0%	67,7%	67,2%
	89,3%*	72,5%*	94,1%	66,2%*	67,9%*	67,9%*
Dodatnia wartość predykcyjna	74,7%	20,0%	87,4%	4,2%	2,1%	0%
	75,0%*	19,6%*	87,0%*	2,7%*	0,0%*	0%*
Ujemna wartość predykcyjna	98,0%	99,5%	98,0%	89,8%	99,5%	99,5%
	98,0%*	99,5%*	98,0%*	89,8%*	99,5%*	99,5%*
Efektywność	90,4%	73,5%	94,5%	61,9%	67,0%	67,7%
	90,6%*	74,0%*	94,4%*	61,8%*	67,7%*	67,7%*

* wyniki po wykluczeniu inwazji mieszanych

W celu określenia ewentualnego wpływu intensywności inwazji na czułość testu, obliczenia powtórzono w grupie, z której wykluczono przypadki parazytemii *P. falciparum* powyżej 5000 zarodźców zimnicy w mm³ oraz w grupie z której wykluczono przypadki parazytemii, poniżej 5000 zarodźców w mm³, a otrzymane wyniki porównano wykorzystując do obliczeń znamienności statystycznej test CHI² (Tabela 3). Przy wyborze parazytemii 5000 zarodźców w mm³ jako wartości granicznej, kierowano się definicją malarii u dzieci w rejonach o wysokim ryzyku transmi-

sji zimnicy stosowaną przez innych autorów (Perkins i wsp. 1997).

Tabela 3. Czulość i swoistość testu *Vision Biotech Pf Rapid Malaria Test* z antygenem HRP-2 w zależności od intensywności inwazji

<i>P. falciparum</i> trofozoity i schizonty	Intensywność inwazji poniżej 5000/mm ³	Intensywność inwazji powyżej 5000/mm ³	Znamiennosc statystyczna
Czulość	90,0% (n = 20)	96,4% (n = 55)	p = 0,614
Swoistość	88,9% (n = 216)	88,9% (n = 216)	p = 1
<i>P. f.</i> – wszystkie formy			
Czulość	93,5% (n = 31)	96,4% (n = 56)	p = 0,936
Swoistość	94,6% (n = 204)	94,6% (n = 204)	p = 1

Wyniki badań wskazują, że testy z antygenem HRP-2 cechują się wysokimi parametrami diagnostycznymi w rozpoznawaniu parazytemii *P. falciparum*, co jest to zgodne z obserwacjami innych autorów (Garcia i wsp. 1996, Kilian i wsp. 1997, Bechem i wsp. 1999, Singh i wsp. 2000). Wysoka czulość, swoistość i związana z nimi efektywność diagnostyczna testów w rozpoznawaniu lub wykluczaniu inwazji *P. falciparum* nie potwierdziła się w inwazjach wywołanych innymi gatunkami zimnicy. Oznacza to, że test z antygenem HRP-2 nie może służyć do wykluczenia zimnicy, jako choroby wywoływanej przez inwazję różnych gatunków zarodźca zimnicy (*Plasmodium* spp.) i dlatego nie może zastąpić badania mikroskopowego metodą grubej kropli i cienkiego rozmazu. Może natomiast z dużym prawdopodobieństwem wykluczyć lub potwierdzić inwazję *P. falciparum*, co ma duże znaczenie kliniczne i rokownicze ze względu na groźne dla życia następstwa związane z sekwestracją zarażonych zarodźcem sierpowatym erytrocytów w naczyniach włosowatych narządów wewnętrznych, a w szczególności mózgowia (Pongponratn i wsp. 1991). Znaczenie wczesnego rozpoznania inwazji podkreśla także fakt rosnącej oporności *P. falciparum* na leki przeciwmalaryczne (Khaliq i wsp. 1987, Brockman i wsp. 2000, Kanya i wsp. 2001).

W badanej próbie nie wykazano statystycznie znamiennej różnicy w czulości wykrywania gametocytów i form bezpłciowych (trofozoity i schizonty) *P. falciparum* ($p = 0.614$). Ogranicza to wartość diagnostyczną testów z antygenem HRP-2, ponieważ gametocyty nie wywołują objawów chorobowych, a działanie gametobójcze wykazują tylko niektóre z leków przeciwmalarycznych (Skinner i wsp. 1996). Dlatego w rejonach o wysokim ryzyku transmisji zimnicy, gdzie notuje się obecność gametocytów we krwi obwodowej bez obecności form bezpłciowych *P. falciparum* (Tabela 1), dodatni wynik testu HRP-2 wymaga weryfikacji badaniem parazytologicznym krwi obwodowej metodą grubej kropli i cienkiego rozmazu. Ponieważ obecność samych gametocytów *P. falciparum* zdarza się dużo rzadziej niż obecność form bezpłciowych, przy braku możliwości weryfikacji wyniku testu nieuzasadniona jest rezygnacja z leczenia przeciwmalarycznego lub jego opóźnienie w oczekiwaniu na wynik badania mikroskopowego krwi obwodowej. Także przy

ocenie czułości testu w zależności od intensywności inwazji nie stwierdzono w badanej grupie znamienych statystycznie różnic, chociaż wynik może sugerować, że czułość testu z antygenem HRP-2 zwiększa się wraz z parazytemią, co opisują niektórzy autorzy (Singh i wsp. 2000). Podawane przez nich zmiany czułości testu dotyczą jednak parazytemii poniżej 400 zarodźców sierpowatych w mikrolitrze krwi obwodowej. Oznacza to, że przy pomocy testu nie można dokonać oceny intensywności parazytemii, która w inwazji *P. falciparum* może być podstawą decyzji dotyczących metod i czasu leczenia przeciwmalarycznego. Ma to szczególne znaczenie w rejonie endemicznym o wysokim ryzyku transmisji zimnicy, gdzie część pacjentów nabywa zdolność tolerancji pewnego poziomu zarodźców zimnicy we krwi bez prezentowania objawów klinicznych. W takich przypadkach pojawienie się objawów zimnicy uzależnione jest od poziomu parazytemii i nie wiąże się jednoznacznie z faktem stwierdzenia obecności form rozwojowych *P. falciparum* we krwi (Rooth i Bjorkman 1992, Armstrong-Schellenberg i wsp. 1994, Genton i wsp. 1994). Natomiast w rejonie o niskim ryzyku transmisji zimnicy, gdzie wystąpienie parazytemii *P. falciparum* jest równoznaczne z malarią, wysoka czułość i swoistość testów z antygenem HRP-2 oraz łatwość jego wykonania (Premji i wsp. 1997) może przyczynić się do szybszego wykrywania obecności zarodźców sierpowatych we krwi obwodowej i rozpoczęcia leczenia przeciwmalarycznego. Może mieć to zasadniczy wpływ na przebieg inwazji i zmniejszenie śmiertelności powodowanej malarią mózgową.

WNIOSKI

(1) Dodatni wynik testu z antygenem HRP-2 u osób z gorączką z dużym prawdopodobieństwem potwierdza inwazję *P. falciparum* i jest wskazaniem do rozpoczęcia leczenia przeciwmalarycznego.

(2) Wynik testu z antygenem HRP-2 powinien być każdorazowo weryfikowany parazytologicznym badaniem krwi metodą grubej kropli i cienkiego rozmazu.

PODZIĘKOWANIA

Przeprowadzenie badań było możliwe dzięki umowie o współpracy pomiędzy Akademią Medyczną im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu a Divine Word University (DWU) w Madang, Papua Nowa Gwinea. Autorzy pracy składają szczególne podziękowania Rektorom obu Uczelni za okazaną życzliwość, a także firmie Vision Biotech z Republiki Południowej Afryki za dostarczenie testów immunochromatograficznych z antygenem HRP-2 oraz personelowi szpitala Modilon i Poradni Pediatrycznej w Madang za pomoc i zaangażowanie w realizację projektu.

LITERATURA

Armstrong-Schellenberg I.R.M., Smith T., Alonso P.L., Hayes R.J. 1994. What is clinical malaria?

- Finding case definition for field research in highly endemic areas. *Parasitology Today* 10: 439-422.
- Bechem N.N., Leke R.F.G., Tietche F., Wallace Taylor D. 1999. Evaluation of a rapid test for histidine-rich protein 2 for diagnosis of *Plasmodium falciparum* infection in Cameroonian children. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 93: 46.
- Brockman A., Price R.N., van Vugt M., Heppner D.G., Walsh D., Sookto P., Wimonwattrawatee T., Looareesuwan S., White N.J., Nosten F. 2000. *Plasmodium falciparum* antimalarial drugs susceptibility on the North-Western border of Thailand during five years of extensive use of artesunate-mefloquine. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 94: 537-544.
- Durrhaim D.N., Grange La J.J., Govere J., Mngomezulu N.M. 1998. Accuracy of a rapid immunochromatographic card test for *Plasmodium falciparum* in a malaria control programme in South Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 92: 32-33.
- Garcia M., Kirimoana S., Marlborough D., Leafasia J., Rieckmann K.H. 1996. Immunochromatographic test for malaria diagnosis. *Lancet* 347: 1549.
- Genton B., Smith T., Baea K., Narara A., Al-Yaman F., Beck H.P., Hii J., Alpers M. 1994. Malaria: how useful are clinical criteria for improving the diagnosis in a highly endemic area? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 88: 537-541.
- Gove S. 1997. Integrated management of childhood illness by outpatient health worker: technical basis and overview. *Bulletin of the World Health Organization* 75 Suppl.1: 7-24.
- Kanya M.R., Dorsey G., Gasasira A., Ndezi G., Babirye J.N., Staedke S.G., Rosenthal P.J. 2001. The comparative efficacy of chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in Kampala, Uganda. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 95: 50-55.
- Khaliq A.A., Fox E., Sarwar M., Strickland T.G. 1987. Amodaquine fails to cure chloroquine resistant *Plasmodium falciparum* in the Punjab. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 81: 157-159.
- Kilian A.H.D., Mughusu E.B., Kabagambe G., von Sonnenburg F. 1997. Comparison of two rapid HRP-2 based diagnostic tests for *Plasmodium falciparum*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 91: 666-667.
- MacPherson G.G., Warrell M.J., White N.J., Looareesuwan S., Warell D.A. 1985. Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. *The American Journal of Pathology* 119: 385-401.
- Makler M.T., Palmer C.J., Ager A.C. 1998. A review of practical techniques for the diagnosis of malaria. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 92: 419-33.
- Payne D. 1988. Use and limitations of light microscopy for diagnosis of malaria at the primary health care level. *Bulletin of the World Health Organizations* 66: 621-626.
- Perkins B.A., Zucker J.R., Otieno J., Jafari H.S., Paxton L., Redd S.C., Nahlen B.L., Schwartz B., Oloo A.J., Olango C., Gove S., Campbell C.C. 1997. Evaluation of an algorithm for integrated management of childhood illness in an area of Kenya with high malaria transmission. *Bulletin of World Health Organization* 75 Suppl. 1: 33-42.
- Pongponratn E., Riganti M., Punpoowong B., Aikawa M. 1991. Microvascular sequestration of parasitized erythrocytes in human falciparum malaria: a pathological study. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 44: 168-175.
- Premji Z., Minjas J.N., Shiff C.J. 1994. Laboratory diagnosis of malaria by village health workers using the rapid manual ParaSight-F test. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 88: 418.
- Rehli N., Pielok L., Kurczewska M. 1998. Trudności diagnostyczne w zimnicy. Opis przypadków. *Biuletyn Metodyczno-Organizacyjny Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej* 31: 94-99.
- Rooth I., Bjorkman A. 1992. Fever episodes in a holoendemic malaria area of Tanzania: parasitological and clinical findings and diagnostic aspects related to malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 86: 479-482.

- Singh N., Saxena A., Valecha N. 2000. Field evaluation of the ICT Malaria Pf/Pv immunochromatographic test for diagnosis of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infection in forest villages of Chhindwara central India. *Tropical Medicine and International Health* 5: 765-770.
- Skinner T.S., Manning L.S., Johnston W.A., Davis T.M. 1996. In vitro stage-specific sensitivity of *Plasmodium falciparum* to quinine and artemisinin drugs. *International Journal of Parasitology* 26: 519-552.
- World Health Organization. 2000. Bench aids for the diagnosis of malaria infections. WHO Geneva: 6.

Zaakceptowano do druku 14 czerwca 2004