

*Karolina Mrówka*

**Przydatność wykrywania antygenów *Plasmodium* spp.  
we krwi obwodowej dla rozpoznawania oraz oceny  
przebiegu klinicznego i skuteczności leczenia malarii  
importowanej do Polski z krajów strefy tropikalnej  
i subtropikalnej**

**Rozprawa doktorska**

**Katedra i Klinika Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych  
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego  
w Poznaniu**

**Promotor: dr hab. n. med. Małgorzata Paul**

Poznań, 2012



Pragnę również bardzo serdecznie podziękować:

Panu Profesorowi doktorowi habilitowanemu **Jerzemu Stefaniakowi**, Kierownikowi Katedry i Kliniki Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, za ogromną życzliwość i cenne rady w trakcie pisania niniejszej rozprawy doktorskiej oraz nieocenioną pomoc w rozwiązywaniu trudnych zagadnień merytorycznych.

Wszystkim **Koleżankom i Kolegom** z Kliniki Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego za udostępnienie danych klinicznych hospitalizowanych pacjentów z malarią.

Śp. Pani magister **Marii Kurczewskiej** za życzliwe wprowadzenie w zagadnienia diagnostyki laboratoryjnej niezbędne przy wykonywaniu badań mikroskopowych krwi obwodowej w kierunku malarii u osób powracających z tropiku.

Pani magister **Krystynie Frąckowiak** oraz Pani magister **Matyldzie Kłudkowskiej** z Pracowni Diagnostyki Parazytologicznej Szpitala Klinicznego im. H. Święcickiego w Poznaniu, za praktyczną pomoc i fachowe wskazówki podczas wykonywania parazytologicznych badań diagnostycznych w kierunku chorób tropikalnych.

**Badania były finansowane przez:**

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu z funduszy przeznaczonych na działalność statutowo-naukową Katedry i Kliniki Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych; projekt badawczy nr 502-01-02204312-03681.

## Spis treści

<b>1. WSTĘP</b> .....	<b>7</b>
1.1. MALARIA JAKO ISTOTNY PROBLEM ZDROWIA MIĘDZYNARODOWEGO .....	7
1.2. ROZPRZESTRZENIENIE GEOGRAFICZNE MALARII NA ŚWIECIE .....	10
1.3. AKTUALNA SYTUACJA EPIDEMIOLOGICZNA MALARII W POLSCE I EUROPIE .....	15
1.4. BIOLOGIA I CYKL ROZWOJOWY ZARODZCA MALARII .....	18
1.5. PATOGENEZA I OBRAZ KLINICZNY MALARII U CZŁOWIEKA .....	22
1.6. ZASADY LABORATORYJNEGO ROZPOZNAWANIA MALARII .....	25
1.7. SPOSOBY ZAPOBIEGANIA I ZWALCZANIA MALARII .....	27
1.8. AKTUALNE MOŻLIWOŚCI LECZENIA MALARII .....	34
1.8.1. <i>Chlorochina</i> .....	35
1.8.2. <i>Amodiachina</i> .....	36
1.8.3. <i>Chinina</i> .....	36
1.8.4. <i>Antagoniści kwasu foliowego</i> .....	37
1.8.5. <i>Meflochina</i> .....	37
1.8.6. <i>Artemizyna i jej pochodne</i> .....	38
1.8.7. <i>Połączenie atowakwonu z proguanilem</i> .....	39
1.8.8. <i>Antybiotyki o działaniu przeciwprzotniaczym</i> .....	39
1.8.9. <i>Prymachina i tafenochina</i> .....	40
<b>2. CELE PRACY</b> .....	<b>41</b>
<b>3. MATERIAŁ I METODY</b> .....	<b>42</b>
3.1. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA BADAŃ .....	42
3.2. PACJENCI OBJĘCI BADAANIAMI EPIDEMIOLOGICZNO-KLINICZNYMI I LABORATORYJNYMI .....	44
3.2.1. <i>Pacjenci zarażeni zarodźcem malarii</i> .....	44
3.2.2. <i>Pacjenci grupy kontrolnej</i> .....	45
3.3. BADAŃIA EPIDEMIOLOGICZNE .....	45
3.4. BADAŃIA KLINICZNE PACJENTÓW .....	47
3.5. BADAŃIA LABORATORYJNE .....	51
3.5.1. <i>Badania morfologiczno-biochemiczne krwi obwodowej</i> .....	51
3.5.2. <i>Badania parazytologiczne rozmazów krwi obwodowej w kierunku zarodźców malarii</i> .....	52
3.5.3. <i>Wykrywanie swoistych przeciwciał w kierunku Plasmodium spp. we krwi obwodowej techniką immunofluorescencji pośredniej</i> .....	56
3.5.4. <i>Wykrywanie swoistych antygenów Plasmodium spp. we krwi obwodowej</i> .....	57
3.5.4.1. <i>Wykrywanie antygeny HRP-2 oraz dehydrogenazy mleczanowej we krwi obwodowej za pomocą testów immunochromatograficznych</i> .....	57
3.5.4.2. <i>Wykrywanie antygeny HRP-2 swoistego dla Plasmodium falciparum we krwi obwodowej za pomocą testu immunoenzymatycznego</i> .....	60
3.6. ZGODNOŚĆ BADAŃ KLINICZNYCH Z ZASADAMI ETYKI .....	62
3.7. ANALIZA STATYSTYCZNA WYNIKÓW BADAŃ .....	63
3.8. DOKUMENTACJA FOTOGRAFICZNA WYNIKÓW BADAŃ .....	63
<b>4. WYNIKI</b> .....	<b>64</b>
4.1. CZĘSTOŚĆ WYSTĘPOWANIA MALARII WŚRÓD OSÓB POWRACAJĄCYCH DO POLSKI Z KRAJÓW ODMIENNEJ STREFY KLIMATYCZNO-SANITARNEJ .....	64
4.2. OKREŚLENIE CZYNNIKÓW RYZYKA ZARAŻENIA <i>PLASMODIUM SPP.</i> U BADANYCH PACJENTÓW .....	65
4.3. OCENA STANU KLINICZNEGO BADANYCH PACJENTÓW .....	72
4.4. WYNIKI LECZENIA PACJENTÓW Z MALARIĄ .....	81
4.5. ANALIZA PARAMETRÓW LABORATORYJNYCH .....	83
4.5.1. <i>Ocena podstawowych parametrów morfologiczno-biochemicznych krwi obwodowej i moczu u badanych pacjentów</i> .....	83

4.5.2. Analiza mikroskopowa preparatów grubej kropli i cienkiego rozmazu krwi obwodowej w kierunku zarodźców malarii u badanych pacjentów .....	85
4.5.3. Wyniki występowania swoistych przeciwciał w kierunku <i>Plasmodium spp.</i> we krwi obwodowej badanych pacjentów.....	91
4.5.4. Wyniki szybkiego testu immunochromatograficznego w kierunku antygenów <i>Plasmodium spp.</i> u badanych pacjentów.....	93
4.5.5. Określenie stężenia antygeny HRP-2 <i>P. falciparum</i> we krwi obwodowej u badanych pacjentów .....	101
<b>5. DYSKUSJA .....</b>	<b>114</b>
5.1. ZAGROŻENIE MALARIĄ DLA OSÓB PODRÓŻUJĄCYCH DO KRAJÓW ODMIENNEJ STREFY KLIMATYCZNO-SANITARNEJ.....	114
5.2. TRUDNOŚCI KLINICZNE I DIAGNOSTYCZNE W ROZPOZNAWANIU MALARII .....	116
5.3. NOWE METODY LABORATORYJNEGO ROZPOZNAWANIA MALARII.....	123
5.4. OCENA WARTOŚCI DIAGNOSTYCZNEJ TESTÓW IMMUNOCHROMATOGRAFICZNYCH I IMMUNOENZYMATYCZNYCH WYKRYWAJĄCYCH SWOISTE ANTYGENY <i>PLASMODIUM SPP.</i> .....	128
5.5. OCENA WARTOŚCI KLINICZNEJ I PROGNOSTYCZNEJ TESTÓW IMMUNODIAGNOSTYCZNYCH WYKRYWAJĄCYCH SWOISTE ANTYGENY <i>PLASMODIUM SPP.</i> .....	136
<b>6. WNIOSKI.....</b>	<b>138</b>
<b>7. STRESZCZENIE .....</b>	<b>139</b>
<b>8. SUMMARY .....</b>	<b>143</b>
<b>9. PIŚMIENNICTWO.....</b>	<b>147</b>
<b>10. SPIS TABEL.....</b>	<b>165</b>
<b>11. SPIS RYCIN .....</b>	<b>166</b>
<b>12. OBJAŚNIENIA UŻYWANYCH SYMBOLI I SKRÓTÓW .....</b>	<b>171</b>

# 1. WSTĘP

## 1.1. Malaria jako istotny problem zdrowia międzynarodowego

Malaria (zimnica) jest chorobą ogólnoustrojową, wywoływaną przez wewnątrzkomórkowego pierwotniaka z rodzaju *Plasmodium*, która może przebiegać w sposób ostry lub przewlekły z zajęciem wielu narządów wewnętrznych i układów oraz wysokim ryzykiem zgonu. Malaria wraz z gruźlicą i zakażeniem ludzkim wirusem upośledzenia odporności (HIV) należy aktualnie do grupy chorób powodujących największą liczbę zachorowań i zgonów w skali ogólnoswiatowej. Jest ona szeroko rozpowszechniona w krajach strefy międzyzwrotnikowej, szczególnie w Afryce Subsaharyjskiej, gdzie występuje ponad 90% wszystkich przypadków zimnicy notowanych przez Światową Organizację Zdrowia (WHO, 2011a). Liczba nowych przypadków zimnicy może dochodzić do prawie 500 milionów zachorowań w ciągu każdego roku, a wysoka liczba zgonów w grupie osób chorujących na malarię jest wciąż niepokojąca. Mimo znacznej wiedzy na temat zapobiegania i wielu narzędzi służących do ograniczenia rozprzestrzeniania się malarii w środowisku, zimnica jest odpowiedzialna za blisko milion przypadków śmiertelnych w skali całego świata i nadal pozostaje ona jednym z największych zabójców kobiet ciężarnych i małych dzieci do 5 roku życia (O'Meara i wsp., 2010). Wysoka śmiertelność w przebiegu zimnicy wynika z jej ciężkiego, wielonarządowego przebiegu klinicznego oraz braku dostępu do specjalistycznych metod diagnostycznych potwierdzających zachorowanie, co opóźnia, a także często uniemożliwia, zastosowanie właściwego leczenia z użyciem leków przeciwmalarycznych, zgodnie z aktualnymi wytycznymi uwzględniającymi zmieniającą się oporność zarodźca malarii na leki. W sytuacji utrudnionego dostępu do badań wykluczających zachorowanie na malarię, o włączeniu leczenia przeciwmalarycznego decyduje obraz kliniczny, który w przypadku zimnicy nie zawsze jest specyficzny (Luxemburger i wsp., 1998; Bojang i wsp., 2000; Chandramohan i wsp., 2002; Magill, 2006). Podawanie leków przeciw pasożytniczych w każdym przypadku stanów gorączkowych i podgorączkowych stymuluje rozwój oporności zarodźca malarii na leki i znacznie utrudnia kontrolę malarii w środowisku (Congpuong i wsp., 2002). Wpływ zimnicy na życie wielu społeczności zamieszkujących obszary odmiennej strefy geograficzno-środowiskowej i higieniczno-sanitarnej jest ogromny nie tylko ze względu na aspekt zdrowotny, ale także niewątpliwe konsekwencje ekonomiczno-gospodarcze

odczuwane dotkliwie zarówno przez pojedyncze osoby i ich rodziny, jak i systemy ekonomiczne i społeczne całych państw (Sachs i Malaney, 2002; Jowett i Miller, 2005). To właśnie malaria tropikalna wywoływana przez *Plasmodium falciparum* jest źródłem największej liczby zgłaszalności pacjentów do ośrodków zdrowia i dyspensariów w ramach pomocy ambulatoryjnej, a także najczęstszą przyczyną hospitalizacji i absencji chorobowej mieszkańców strefy międzyzwrotnikowej (Ryc. 1). Międzynarodowe fundusze przeznaczone na walkę z malarią osiągnęły w 2011 r. rekordową do tej pory wartość około 2 bilionów US\$, ale pozostają one i tak w granicach wyraźnie poniżej poziomu wymaganych wydatków 5 bilionów US\$, przewidywanych na programy kontroli i zwalczania malarii w latach 2010-2015 (WHO, 2011a).



**Ryc. 1. Chłopiec 2-letni hospitalizowany z powodu zagrażającej życiu malarii mózgowej wywołanej przez *Plasmodium falciparum*. Kenya Medical Research Institute w Kilifi (Kenia).**

Malaria staje się narastającym problemem zdrowotnym także w nie-endemicznych krajach strefy umiarkowanej, gdyż szybki rozwój środków łączności, transportu i komunikacji, a także bogate oferty organizatorów usług turystycznych, będące odpowiedzią na zwiększające się zainteresowanie podróżowaniem powodują, że liczba osób wyjeżdżających do obszarów strefy tropikalnej ciągle się zwiększa. Wraz z ekspansją człowieka w rejony krajów gorących zwiększa się ryzyko importowania wielu egzotycznych jednostek chorobowych, w tym malarii, która jest jedną z



najcięższych chorób importowanych do krajów europejskich z innych stref klimatycznych. Liczba zgonów spowodowanych malarią w Europie i w Polsce jest nadal zbyt duża i wynika, nie z braku dostępu do ośrodków opieki zdrowotnej, czego doświadczają osoby chore na zimnicę w krajach rozwijających się, lecz z istotnego opóźnienia w postawieniu prawidłowego rozpoznania (Whitty i wsp., 2012). Poza rejonami jej endemicznego występowania, malarii nie uwzględnia się zwykle w diagnostyce różnicowej chorób gorączkowych, gdyż świadomość zagrożenia jest w środowisku medycznym nadal zbyt niska, a fakt, iż każdy objaw kliniczny u chorego powracającego z tropiku może być przyczyną zimnicy, znacznie utrudnia wysunięcie podejrzenia zachorowania. Zbyt późne rozpoznanie malarii u pacjenta może także wynikać z niedostatecznej liczby referencyjnych laboratoriów parazytologicznych i tropikalnych, w których pracują osoby z dużym doświadczeniem praktycznym w rozpoznawaniu chorób pasożytniczych i stosują aktualnie obowiązujące na świecie, specjalistyczne metody diagnostyczne (Kain i Keystone, 1998). **W rozprawie doktorskiej poddano wnikliwej analizie szeroką grupę pacjentów gorączkujących po powrocie z krajów strefy międzyzwrotnikowej i subtropikalnej, hospitalizowanych w Klinice Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, oceniając szczegółowo odsetek osób, u których ostatecznie potwierdzono inwazje wywołane przez zarodźca zimnicy *Plasmodium* spp.**

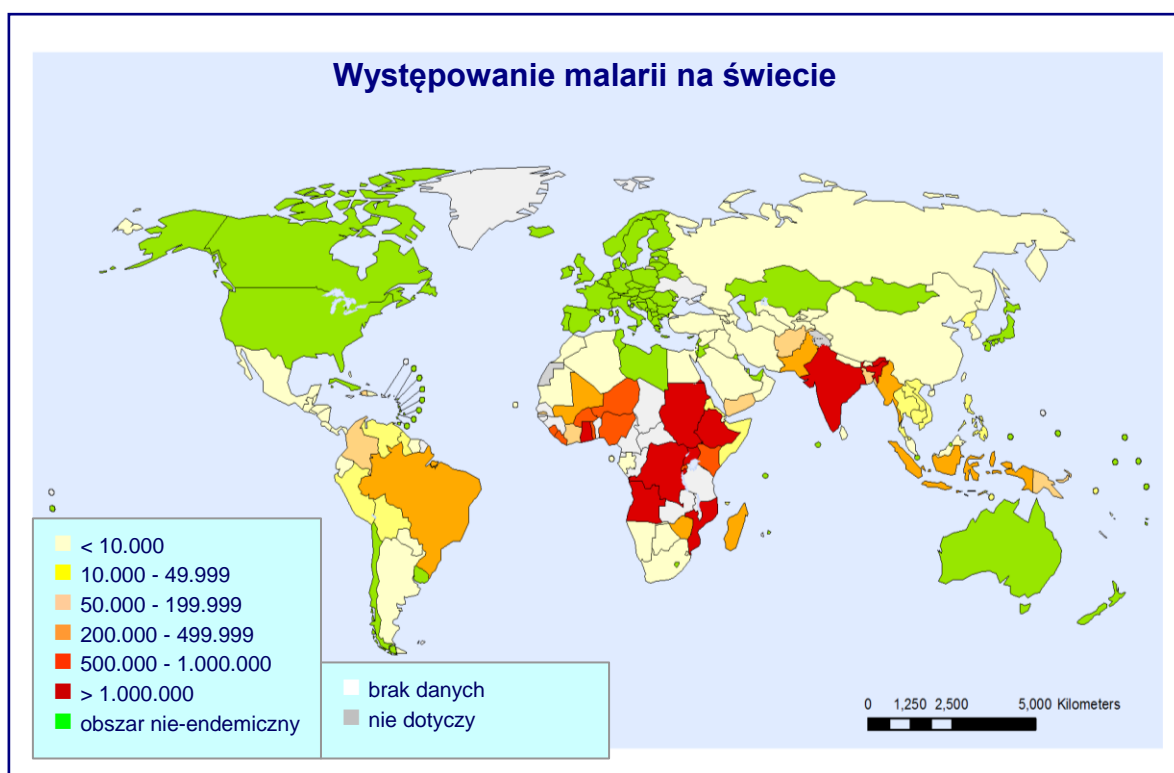
Na przestrzeni ostatnich lat, dokonują się znaczące postępy w dziedzinie ograniczenia rozprzestrzeniania się malarii na świecie. Do roku 2010, dzięki szeroko propagowanym akcjom Światowej Organizacji Zdrowia w ramach programu „*Roll Back Malaria*” i współpracy lokalnych służb sanitarno-epidemiologicznych, udało się w istotny sposób ograniczyć liczbę zachorowań o co najmniej 50% w porównaniu do roku 2000. Do najważniejszych wyzwań w zakresie kontroli i zwalczania malarii w krajach endemicznych należą w chwili obecnej: (i) zmniejszenie liczby zgonów z powodu malarii do liczby bliskiej zeru do końca 2015 roku, (ii) ograniczenie ogólnej liczby zachorowań na malarię do końca 2015 roku o 75%, w porównaniu do roku 2000, (iii) uzyskanie całkowitej eradykacji malarii w 10 nowych krajach, w których pojawiła się ona po 2006 roku, z uwzględnieniem rejonów południowo-europejskich, (iv) opracowanie i wdrożenie do codziennej praktyki klinicznej skutecznej szczepionki przeciwmalarycznej zarówno dla mieszkańców strefy endemicznej, jak i dla osób podróżujących do obszarów strefy tropikalnej i subtropikalnej (WHO, 2011a).

Natomiast w krajach nie-endemicznych, w których obserwuje się jedynie przypadki importowane z obszarów strefy gorącej, do wiodących zadań programu walki z malarią należą: (i) promowanie referencyjnych ośrodków medycyny tropikalnej, posiadających praktyczne doświadczenie kliniczne i diagnostyczne w tej dziedzinie, (ii) profesjonalne szkolenie lekarzy różnych specjalności klinicznych w zakresie chorób tropikalnych i medycyny podróży, (iii) doskonalenie umiejętności mikroskopowego rozpoznawania malarii wśród diagnostów laboratoryjnych oraz (iv) zacieśnienie współpracy z organizatorami usług turystycznych i biurami podróży, w zakresie informowania klientów o szczególnych zagrożeniach życia i zdrowia na odwiedzanych terenach oraz skutecznych możliwościach im zapobiegania, zgodnie z obowiązującą w Polsce „Ustawą o usługach turystycznych” z dnia 29 sierpnia 1997 roku (Dz. U. z 2004 r., Nr 223, poz. 2268), z późniejszymi zmianami oraz „Ustawą o zmianie ustawy o usługach turystycznych” z dnia 29 kwietnia 2010 roku (Dz. U. z 2010 r., Nr 106, poz. 672).

## **1.2. Rozprzestrzenienie geograficzne malarii na świecie**

Aktualnie, malaria występuje endemicznie w 107 krajach i terytoriach administracyjnych świata, które rozmieszczone są przede wszystkim w Afryce Subsaharyjskiej, Ameryce Południowej, Azji Południowo-Wschodniej i wyspach Dalekiego Pacyfiku (Ryc. 2). Według danych szacunkowych Światowej Organizacji Zdrowia, w krajach endemicznego występowania zimnicy żyje około 3,3 miliarda osób, co stanowi około 42% populacji całego świata. W latach 2000-2010, zanotowano znaczącą redukcję liczby zachorowań na malarię o ponad 50% w 43 spośród 99 krajów ze stałą transmisją *Plasmodium* spp., a w pozostałych 8 – spadkową tendencję liczby zarażeń o 25-50%. W roku 2006, aż 1,2 mld osób zamieszkiwało tereny wysokiego ryzyka malarii (więcej niż 1 przypadek na 1000 mieszkańców), przeważnie w Afryce Subsaharyjskiej (49%) oraz Azji Południowo-Wschodniej (37%). Liczba objawowych przypadków malarii została oszacowana na 247 mln, z czego 230 mln to zachorowania na złośliwą malarię tropikalną *P. falciparum* (91%). Największą liczbę zachorowań zaobserwowano w Afryce (212 mln, 86%), Azji Południowo-Wschodniej (21 mln, 9%), a zdecydowanie mniej w krajach Basenu Morza Śródziemnego (8 mln, 3%). Spośród krajów afrykańskich, największą liczbę przypadków malarii notowano w Nigerii, Republice Demokratycznej Konga,

Etiopii, Tanzanii i Kenii, natomiast na pozostałym obszarze geograficznym – w Indiach, Sudanie, Birmie (Myanmar), Bangladeszu, Indonezji, Papui-Nowej Gwinei i Pakistanie. Zarejestrowana w 2006 roku liczba zgonów z powodu malarii wynosiła 881 tysięcy, z czego w Afryce zanotowano największą liczbę przypadków śmiertelnych wynosząca 801 tys. (90%), natomiast we wschodnim obszarze śródziemnomorskim - 38 tys. (4,3%), a w Azji Południowo-Wschodniej - 36 tys. (4,1%). Najmniej przypadków zachorowań i zgonów notowano w krajach Ameryki Łacińskiej, odpowiednio 6 mln i 6 tys. (2%). Zgony wśród dzieci poniżej 5 roku życia, stanowiły 85% wszystkich przypadków śmiertelnych z powodu malarii. Najwyższy odsetek zgonów z powodu zimnicy u najmłodszych pacjentów zarejestrowano w Afryce (88%) i krajach Basenu Morza Śródziemnego (76%), znacząco niższy w Azji Południowo-Wschodniej (35%) oraz Ameryce Łacińskiej (29%) (WHO, 2008).



**Ryc. 2. Rozprzestrzenienie geograficzne oraz liczba zarejestrowanych przypadków malarii na świecie w 2010 roku (wg Światowej Organizacji Zdrowia, 2012).**

Ostatni raport Światowej Organizacji Zdrowia wykazał, iż w roku 2010, zarejestrowano już tylko 216 milionów epizodów malarii w rejonach endemicznych, z czego 174 mln, czyli 81% dotyczyło rejonów tropikalnej Afryki. Zarejestrowana liczba przypadków śmiertelnych z powodu malarii w 2010 r. osiągnęła 655 tysięcy, z czego

91% było odnotowanych w Afryce i aż 86% u małych dzieci poniżej 5 roku życia. Od 2010 r., szacunkowa częstość występowania malarii na świecie uległa istotnemu zmniejszeniu o 17%, a liczba przypadków śmiertelnych znacząco spadła o 26% (WHO, 2011a).

Wysoka śmiertelność z powodu zimnicy w krajach rozwijających się jest spowodowana brakiem właściwej opieki medycznej, która gwarantowałaby szybkie rozpoznanie choroby i włączenie skutecznego leczenia przyczynowego oraz wciąż niewystarczającym dostępem do środków profilaktycznych w postaci leków przeciwmalarycznych i mechanicznych środków ochrony przed ukłuciami komarów, które w znaczny sposób zmniejszają ryzyko zachorowania.

Na malarię choruje także duża grupa osób, które przebywają w krajach tropikalnych okresowo. Należą do nich turyści, dyplomaci, misjonarze, wolontariusze akcji humanitarnych, pracownicy medyczni, żołnierze misji stabilizacyjnych, personel samolotów pasażerskich oraz emigranci i ich potomkowie, wśród których znajdują się podróżni (często studenci i ich bliscy) odwiedzający członków swoich rodzin, krewnych i przyjaciół w rejonach endemicznego występowania zimnicy. U każdej z powyższych grup podróżnych, ryzyko rozwoju ciężkiej postaci zimnicy może wzrastać nawet 27-krotnie w porównaniu do osób mieszkających w tropiku na stałe. Wynika to z braku obecności swoistych przeciwciał przeciwmalarycznych, które pojawiają się w ustroju człowieka po przechorowaniu malarii i których stałą syntezę stymuluje ciągły kontakt z antygenami pasożyta. U osób dorosłych zamieszkujących tereny endemicznego występowania *Plasmodium* spp., częściową odporność przeciwmalaryczną (ang. *antimalarial semi-immunity*) warunkuje stałe utrzymywanie się niewielkiej parazytemii we krwi obwodowej w wyniku kolejnych, regularnych zarażeń zarodźcem zimnicy, przy braku obecności objawów klinicznych choroby.

Utrzymywanie się malarii na danym terenie geograficznym wymaga występowania łącznie kilku czynników, takich jak: (i) rezerwuar ludzi zarażonych, (ii) podatne osoby niezarażone, (iii) właściwy wektor, którym jest samica komara z rodzaju *Anopheles* (Ryc. 3) oraz (iv) szereg czynników klimatyczno-środowiskowych, umożliwiających przeżywalność zarówno wektora jak i pasożyta. Człowiek jest jedynym rezerwuarem w przyrodzie dla zarodźców *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* i *P. falciparum* oraz wraz z małpami makakowatymi w Azji Południowo-Wschodniej – dla zarodźca *P. knowlesi*. Szacunkowy pomiar odsetka zarażonej populacji umożliwia wskaźnik śledzionowy, określający procent osób z powiększoną śledzioną na danym terenie (tzw. wskaźnik

Hacketta). W strefie hipoendemicznej wskaźnik śledzionowy u dzieci w wieku 2-9 lat nie przekracza 10%, w mezoendemicznej wynosi od 11% do 50%, w hiperendemicznej jest zawsze większy niż 50% i jest wysoki także u osób dorosłych, a strefa holoendemiczna to obszar, gdzie wskaźnik śledzionowy u dzieci jest bardzo wysoki (przekracza 75%), a u dorosłych niski przy współistniejącej dużej tolerancji na zarażenie (Allam i wsp., 2008; Dzbeński i wsp., 2009).



**Ryc. 3. Tropikalny las deszczowy strefy równikowej, środowiskiem sprzyjającym transmisji zarodźców zimnicy przez komary z rodzaju *Anopheles*. Osada w Dżungli Amazońskiej, Iquitos (Peru).**

Głównym sposobem rozprzestrzeniania się malarii jest ukłucie człowieka przez zarażoną samicę komara z rodzaju *Anopheles*, co wskazuje na to, że temperatura i wilgotność otoczenia regulujące zasięg geograficzny i natężenie wektora są głównymi czynnikami decydującymi o występowaniu malarii w środowisku. Zarażenie *Plasmodium* spp. nie występuje w rejonach, gdzie temperatura w ciągu doby spada poniżej 16 °C i przekracza 33 °C, na wysokości powyżej 2000-2200 m n.p.m. oraz na obszarach pustynnych (Gilles, 1988). Niestety, zasięg geograficzny zimnicy ciągle się poszerza i nieustannie zmienia, co wynika niewątpliwie z wpływu człowieka na środowisko. Natomiast, globalne ocieplenie się klimatu, dynamika migracji ludności

na Ziemi, zaludnianie terenów wcześniej niedostępnych i ich adaptacja poprzez wycinanie lasów, zmianę stopnia nawodnienia gleby oraz proces urbanizacji decydują o powrocie zimnicy na terytoria wcześniej uwolnione od tej groźnej dla życia człowieka choroby. **U pacjentów z malarią hospitalizowanych w Klinice, przeprowadzono szczegółowe badania epidemiologiczne dla oceny geograficznej miejsca zarażenia *Plasmodium* spp., długości pobytu w rejonach endemicznego występowania choroby, celu i charakteru podróży tropikalnej oraz warunków pobytu na obszarach odmiennej strefy klimatyczno-sanitarnej. Do chwili obecnej nie notowano w Ośrodku Poznańskim przypadków malarii importowanych z obszaru klimatu śródziemnomorskiego.**

Spośród innych, rzadszych sposobów transmisji zarodźca zimnicy, które również wpływają na wzrost jej rozprzestrzenienia geograficznego, należy wziąć pod uwagę (i) transfuzje zarażonej krwi, zwłaszcza na obszarach endemicznych (1/25.000 przetoczeń) (Diop i wsp., 2009; Garraud i Andreu, 2009), (ii) transplantacje narządów wewnętrznych (Chiche i wsp., 2003), (iii) zarażenie poprzez strzykawki zanieczyszczone krwią chorego w okresie parazytemii (narkomani, zaniedbania higieniczne personelu medycznego) (Kocięcka i wsp., 1990; Dziubek i wsp., 1993), (iv) przypadkowe zakłucia w trakcie pracy z zarażonym materiałem biologicznym w laboratorium diagnostycznym (Herwaldt i Juranek, 1993), a także (v) drogę przezłożyskową (malaria wrodzona) (Rijken i wsp., 2012). Aktualnie obowiązuje międzynarodowa klasyfikacja przypadków zimnicy, opracowana przez Światową Organizację Zdrowia, ze względu na różnorodne mechanizmy transmisji zarażenia u człowieka: (i) rodzime przypadki przenoszone przez lokalne komary *Anopheles* spp. (malaria autochtoniczna), (ii) przypadki przenoszone przez komary przywleczone z tropiku (malaria wprowadzona), jak np. malaria lotniskowa wśród personelu naziemnego międzynarodowych portów lotniczych, (iii) przypadki importowane, czyli przywlekane z rejonów endemicznych (malaria importowana), (iv) przypadki przeniesione w sposób sztuczny, np. przez przetoczenie zarażonej krwi z przyczyn jatrogennych (malaria indukowana) (Kitchen i Chiodini, 2006) oraz (v) przypadki malarii nawrotowej (np. w wyniku reaktywacji *P. vivax*, *P. ovale* lub *P. malariae*) (WHO, 2005; Dzbeński i wsp., 2009). Globalny wpływ malarii na stan zdrowia i życie społeczeństw jest ewidentny nie tylko w rejonach endemicznych, ale także poza tymi obszarami, gdyż obserwuje się stały wzrost zachorowań opisywanych jako kolejne,

zaskakujące przypadki rodzimej (autochtonicznej) malarii na coraz to nowych obszarach geograficznych (Cuadros i wsp., 2002; Danis i wsp., 2011).

### **1.3. Aktualna sytuacja epidemiologiczna malarii w Polsce i Europie**

W Polsce występują jedynie przypadki malarii importowanej (zawlekanej) z krajów endemicznych odmiennej strefy geograficzno-klimatycznej, a ich liczba utrzymuje się każdego roku na poziomie około 20-50 nowych zachorowań. Szacunkowe dane epidemiologiczne wskazują, iż rocznie około 120-150 zarażeń *Plasmodium* spp. wśród obywateli polskich jest leczonych poza terytorium naszego kraju, głównie u misjonarzy, wolontariuszy akcji humanitarnych, marynarzy, personelu samolotów pasażerskich, żołnierzy misji pokojowych i rzadziej podróżników (Dzbeński i wsp., 2009).

Malaria utrzymywała się w Polsce przez wiele stuleci, o czym świadczą średniowieczne opisy przypadków „napadowej febry”, leczonej wówczas w tradycyjnej medycynie ludowej ziołami, a zwłaszcza wywarem z liści bukszpanu (*Buxus sempervirens*). To właśnie w tych czasach powstała polska nazwa „zimnica”, wywodząca się od charakterystycznej cechy obrazu klinicznego choroby („zimna febra”). Jedynym, rodzimym gatunkiem zarodźca zimnicy rozwijającym się w Polsce był wyłącznie *Plasmodium vivax*. Pierwsze naukowe opisy malarii pochodzą dopiero z roku 1835, a wielkie polskie epidemie malarii z drugiej połowy XIX wieku leczone chininą były tematem obszernych opracowań klinicznych Tytusa Chałubińskiego i Władysława Biegańskiego. Władze sanitarne wprowadziły, trwający do dzisiaj, obowiązek rejestracji wszystkich przypadków zachorowań na malarię w Polsce w 1919 roku. Światowa Organizacja Zdrowia uznała Polskę za wolną od rodzimej transmisji malarii dopiero w 1963 roku. Mimo, iż od ostatniego zarejestrowanego w Polsce przypadku malarii rodzimej (autochtonicznej) na Żuławach Wiślanych, który miał miejsce w 1957 roku, minęło już prawie 55 lat, nadal istnieją w naszym kraju niezbędne warunki środowiskowe, sprzyjające transmisji *P. vivax* na człowieka. Dogodne dla rozwoju komarów z rodzaju *Anopheles* czynniki klimatyczne utrzymują się w Polsce przez okres 99-118 dni i trwają od czerwca do początku września, ze szczytem przypadającym w miesiącu lipcu (Dzbeński i wsp., 2009).

Zgodnie z aktualnie obowiązującą „Ustawą o zapobieganiu oraz zwalczaniu zakażeń i chorób zakaźnych u ludzi” z dnia 5 grudnia 2008 r. (Dz.U. Nr 234, poz.



1570), każdy przypadek zimnicy podlega w Polsce obowiązkowi zgłoszenia do stacji sanitarno-epidemiologicznej. Według meldunków Państwowego Zakładu Higieny – Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego w Warszawie, w 2010 roku zarejestrowano w kraju 35 nowych zachorowań na zimnicę u pacjentów hospitalizowanych w klinikach chorób tropikalnych i oddziałach chorób zakaźnych, którzy pochodzili głównie z województwa zachodniopomorskiego, łódzkiego, mazowieckiego i śląskiego. Natomiast pojedyncze przypadki zachorowań objęte zgłoszeniem, notowano na terenie województwa dolnośląskiego, lubelskiego, małopolskiego, podkarpackiego, pomorskiego i wielkopolskiego. Niestety, rejestr Państwowego Zakładu Higieny – Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego w Warszawie nie uwzględnia szczegółowo nazw gatunkowych zarodźców zimnicy, rozpoznawanych u polskich pacjentów. **W rozprawie doktorskiej podsumowano udokumentowane parazytologicznie przypadki malarii, rozpoznane w Klinice Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, u pacjentów z województwa wielkopolskiego oraz przekazywanych z oddziałów chorób zakaźnych lub szpitalnych oddziałów ratunkowych z całej Polski transportem sanitarnym (w tym lotniczym) w trybie nagłym z powodu stanu zagrożenia życia i zdrowia.**

Do niedawna uważano, iż w Europie nie występuje stała transmisja zarodźców zimnicy, z wyjątkiem nielicznych przypadków malarii lotniskowej rozwijającej się sezonowo w pobliżu dużych, międzynarodowych portów lotniczych, np. w Madrycie i Londynie. Rzadkie przypadki krótkotrwałej transmisji, wywodzącej się od zarażeń importowanych z obszarów endemicznych notowano w ostatnich latach w Bułgarii, Grecji, Hiszpanii, Macedonii, Mołdawii, Niemczech, we Włoszech oraz na Białorusi (Dzbeński i wsp., 2009).

Wszystkie przypadki malarii rejestrowanej w Europie pozostają pod ścisłym nadzorem Europejskiego Centrum Kontroli i Zwalczania Chorób (ECDC) w Sztokholmie oraz *European Network for Tropical Medicine and Travel Health* (TropNet) z ośrodkiem koordynującym w Bazylei (dawniej: *European Network on Imported Infectious Diseases Surveillance* - TropNetEurop), której lokalne przedstawicielstwo mieści się w Katedrze i Klinice Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych w Poznaniu (Mühlberger i wsp., 2004; Jelinek, 2008). Według aktualnych danych epidemiologicznych, w Europie rejestruje się około 15 tys. przypadków malarii importowanej rocznie (Steffen i wsp., 2007). W okresie od



stycznia 2004 roku do marca 2010 r., wiodące w Europie instytuty chorób tropikalnych, zrzeszone w ramach Europejskiej Sieci Naukowej TropNetEurop udokumentowały łącznie 4533 przypadków malarii, w tym aż 3828 zachorowań wywołanych przez najbardziej niebezpiecznego dla człowieka zarodźca sierpowatego *P. falciparum*. W 2009 roku, w ramach programu TropNet zarejestrowano 560 przypadków malarii importowanej do Europy z krajów endemicznych, w tym 470 zachorowań na zimnicę *P. falciparum*, 49 przypadków zarażeń *P. vivax*, 17 inwazji *P. ovale*, 13 przypadków zachorowań na *P. malariae*, 5 inwazji mieszanych oraz 9 zarażeń *Plasmodium* spp. o nieustalonej nazwie gatunkowej pasożyta. Wśród pacjentów z malarią importowaną do Europy, przeważającą grupę chorych stanowili nie turyści, ale imigranci i uchodźcy (62%) z Afryki Zachodniej - Nigerii, Kamerunu, Beninu i Ghany. W pierwszych trzech miesiącach 2010 roku, potwierdzono kolejnych 49 przypadków zimnicy wśród osób powracających do Europy z obszarów tropikalnych i subtropikalnych, przy czym 86% zachorowań stanowiły przypadki najgroźniejszej dla człowieka inwazji *P. falciparum* (41 pacjentów) (*European Network for Tropical Medicine and Travel Health*, dane niepublikowane).

Niezależne badania *European Network for Tropical Medicine and Travel Health* wykazały, iż w latach 2000-2005 udokumentowano w Okręgu Moskiewskim 851 przypadków malarii wywołanej przez *P. vivax*, z czego aż 206 zachorowań (24%) stanowiły przypadki malarii autochtonicznej rozwijającej się sezonowo na obszarze ciepłych jezior rekreacyjnych w okolicach Moskwy; 96% przypadków zachorowań odnotowano wśród mieszkańców stolicy. Szczepy *P. vivax* występujące na terytorium Federacji Rosyjskiej wykazują wrażliwość na chlorochinę. Przyczyną utrzymywania się miejscowej transmisji malarii, były najprawdopodobniej osoby podróżujące, powracające z krajów tropikalnych z malarią *P. vivax*, lokalnie występujące komary z rodzaju *Anopheles* oraz sprzyjające warunki środowiskowe w wiosenno-letniej porze roku. W 2005 roku, spośród zarejestrowanych 98 zachorowań na malarię w rejonie moskiewskim, 34 przypadki były następstwem lokalnej transmisji zarażenia na terytorium Rosji (35%). Aktualnie, niepokojące ryzyko rodzimej transmisji malarii, utrzymuje się również w południowej części Rosji przy granicy z Azerbejdżanem oraz w dolinach rzeki Wołgi i Donu (Pshenichnaya i Paul, 2011). Spośród byłych Republiki Związku Radzieckiego, malaria autochtoniczna wywołana przez *P. vivax* jest rozprzestrzeniona nie tylko w Azerbejdżanie, ale również w Kirgizji, Uzbekistanie i Tadżykistanie. Gruzja, Turkmenistan i Armenia są wolne od rodzimej transmisji

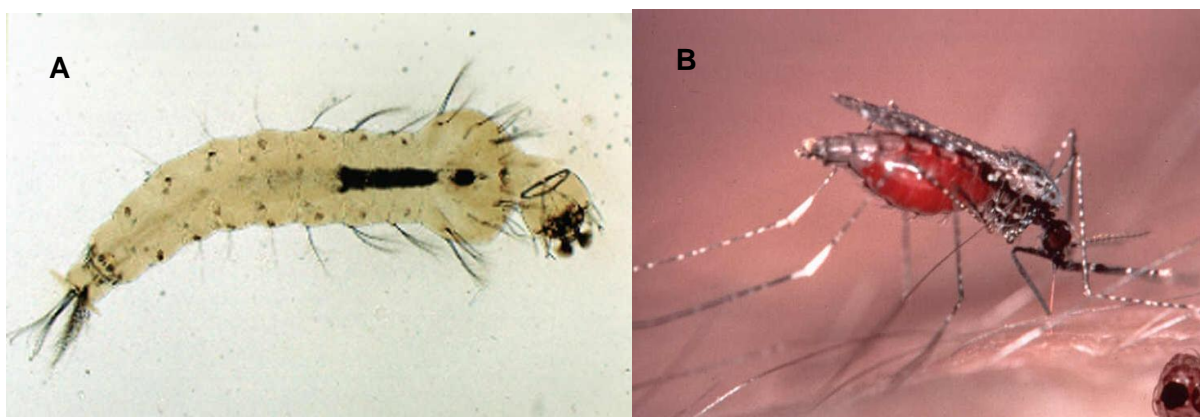
zarodźca ruchliwego dopiero od 2010-2011 roku. Natomiast, ostatnie przypadki *P. falciparum* były notowane w Tadżykistanie w 2009 r. Z kolei w Turcji, notowano jeszcze 9 przypadków *P. vivax* w 2010 roku (WHO, 2011a). Do chwili obecnej nie obserwowano w Klinice zachorowań na malarię nabywanych na terytorium byłych republik Federacji Rosyjskiej.

W maju 2011 roku, pojawiły się kolejne doniesienia o przypadkach rodzimej transmisji zarodźca zimnicy na terytorium Grecji, w której malaria autochtoniczna została już całkowicie wyeliminowana do 1974 roku, w wyniku narodowego programu eradykacji. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia, do października 2012 roku, potwierdzono ponad 30 przypadków malarii *P. vivax* o lokalnej transmisji zarażenia wśród mieszkańców wysp greckich, którzy nie podróżowali poza terytorium swego ojczystego kraju. Pacjenci pochodzili z południowej części Półwyspu Peloponeskiego, rolniczych rejonów Attyki (Marathon i Markopoulo) oraz Lakonii (Evrotas), a także wyspy Eubeja w Grecji wschodniej. Centrum Kontroli i Zwalczenia Chorób Zakaźnych (CDC) w Atlancie (Georgia, Stany Zjednoczone) zaleca podróżnym udającym się na tereny wiejskie wysp greckich farmakologiczną profilaktykę przeciwmalaryczną w postaci chlorochiny, połączenia atowakwonu z proguanilem (Malarone) lub meflochiny (Lariam) oraz stosowanie mechanicznych środków ochrony przed ukłuciami komarów (Danis i wsp., 2011).

#### **1.4. Biologia i cykl rozwojowy zarodźca malarii**

Zimnicę wywołuje u człowieka pięć gatunków zarodźca malarii, do których należą: zarodziec ruchliwy *Plasmodium vivax*, zarodziec owalny *Plasmodium ovale*, zarodziec pasmowaty *Plasmodium malariae*, pochodzący od małp makakowatych *Plasmodium knowlesi* oraz zarodziec sierpowaty *Plasmodium falciparum*, odpowiadający za największą liczbę zachorowań i zgonów z powodu malarii na świecie. Istnieją uzasadnione przypuszczenia, iż w niedalekiej przyszłości również inne gatunki *Plasmodium* chorobotwórcze dla zwierząt, będą mogły stanowić potencjalne zagrożenie dla człowieka, np. *Plasmodium cynomolgi* lub *Plasmodium gaboni*. Zarodziec zimnicy jest wewnątrzkomórkowym pierwotniakiem, który posiada w swym złożonym cyklu rozwojowym dwóch żywicieli, a mianowicie - samicę komara z rodzaju *Anopheles* (Ryc. 4), będącą żywicielem ostatecznym i zarazem wektorem (przenosicielem zarażenia) oraz człowieka, który jest dla pasożyta żywicielem

pośrednim. W ciele komara dochodzi do rozmnażania płciowego (sporogonia), a w organizmie człowieka - do rozmnażania bezpłciowego (schizogonia) (Ryc. 5). Po ukłuciu skóry człowieka przez samicę komara widliszka, z przewodów ślinowych do krążenia żywiciela pośredniego uwalniają się formy inwazyjne, czyli sporozoity, które w ciągu około 45 minut przedostają się do komórek parenchymalnych wątroby. Liczba wstrzykniętych sporozoitów wynosi najczęściej od 8 do 15, ale w niektórych sytuacjach może dochodzić nawet do 100 (Garnham, 1988).



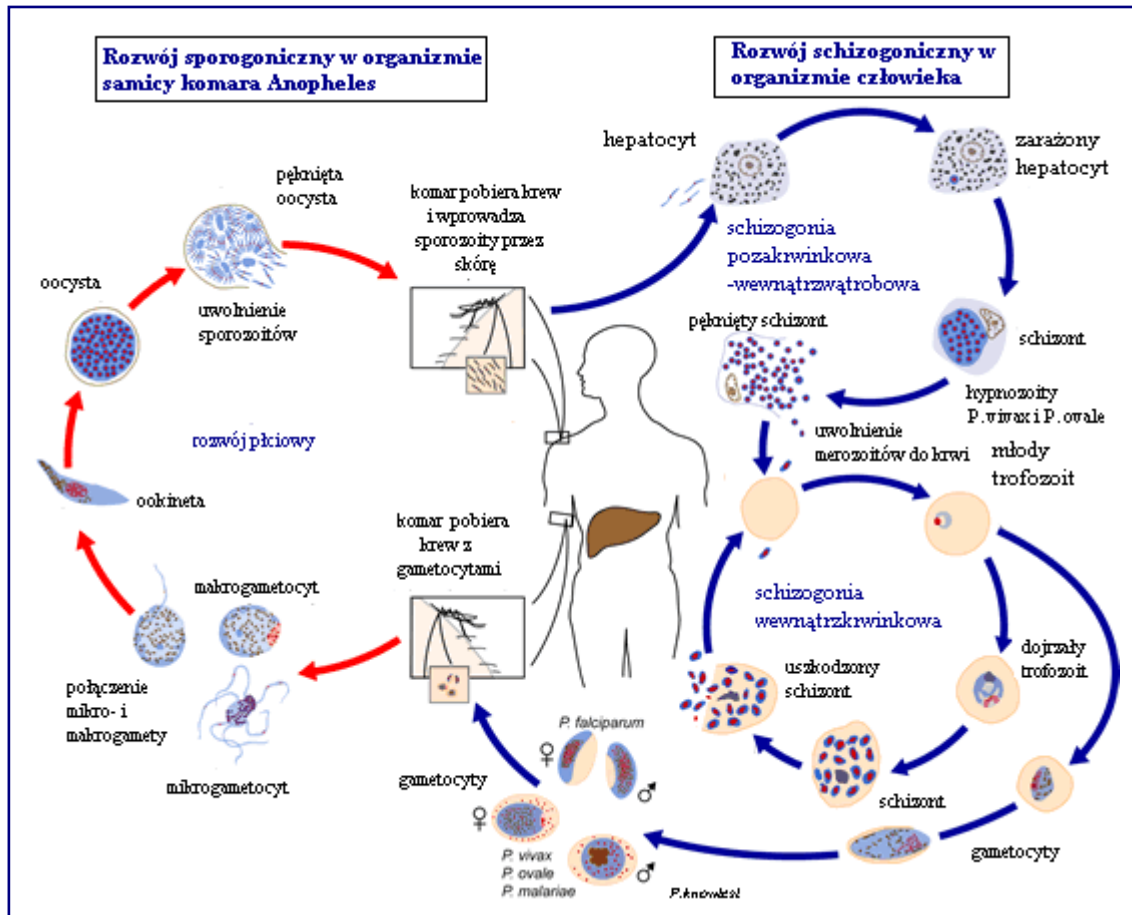
**Ryc. 4. Cechy morfologiczne różnych stadiów rozwojowych komarów z rodzaju *Anopheles*: A) postać larwalna rozwijająca się w zbiornikach wodnych, B) postać dorosła (imago).**

W komórkach wątroby rozpoczyna się pierwszy cykl rozwojowy pasożyta, czyli schizogonia wątrobowa, którego rezultatem jest wytworzenie merozoitów odpowiedzialnych za zniszczenie hepatocytów i w dalszej kolejności - zarażenie erytrocytów krwi obwodowej. Czas podziałów schizogonicznych w wątrobie wynosi od 5,5 (*P. falciparum*) do 15 dni (*P. malariae*) (Garnham, 1988; Warrell i Gilles, 2002). Liczba merozoitów wytworzonych w hepatocytach zależy od gatunku pasożyta i waha się od 2.000 w przypadku *P. malariae*, poprzez 10.000 i 15.000 dla *P. vivax* i *P. ovale* oraz do 30.000 w inwazji *P. falciparum*. Część wytworzonych merozoitów przekształca się w hypnozoity, czyli formy uśpione o zwolnionym metabolizmie, odpowiedzialne za nawroty zimnicy wywoływanej przez *P. vivax* i *P. ovale*. *P. malariae* nie wytwarza hypnozoitów, a nawroty choroby, niekiedy po kilkunastu, a nawet kilkudziesięciu latach wywoływane są przez formy przetrwałe w łożysku naczyniowym, odpowiedzialne za niewielką, submikroskopową parazytamię (Vinetz i wsp., 1998; Cook i Zumla, 2009).

Z kolei, w krwinkach czerwonych żywiciela pośredniego zachodzi główny cykl rozwojowy zarodźca, w trakcie którego następuje dojrzewanie pasożyta od postaci młodego trofozoitu przybierającego formę „pierścienia” przez dojrzałe trofozoity, czyli schizonty, do uformowania merozoitów – ścielnie wypełniających, a następnie niszczących erytrocyty. Merozoity, w liczbie od 6 do 36, uwolnione z krwinek czerwonych zarażają kolejne komórki w sposób logarytmiczny, czyli liczba pasożytów zwiększa się 10-krotnie w ciągu każdego cyklu (Warrell i Gilles, 2002). Aktywne wnikanie merozoitów do krwinek czerwonych umożliwia kompleks apikalny zlokalizowany na powierzchni pierwotniaków oraz antygeny powierzchniowe erytrocytów, które należą do rodziny antygeny grupowego Duffy w przypadku inwazji *P. vivax* oraz EBA 175, będących produktem genów produkujących białka podobne do antygeny Duffy dla *P. falciparum*. Receptory erytrocytarne dla *P. ovale* i *P. malariae* są do chwili obecnej nieznanne (Cowman i Kappe, 2006). W zależności od gatunku pierwotniaka, *P. vivax* i *P. ovale* atakują młode krwinki do 2 tygodni po uwolnieniu ze szpiku kostnego, *P. malariae* wybiera krwinki starsze, a *P. falciparum* rozwija się we wszystkich krwinkach czerwonych, na każdym etapie ich rozwoju, wywołując zwykle wyższą parazytemię, niż inne gatunki pasożyta (Simpson i wsp., 1999; Cook i Zumla, 2009). W krwince czerwonej, zarodek zimnicy odżywia się aminokwasami pochodzącymi z rozpadu łańcucha białkowego hemoglobiny. By uniknąć toksycznego działania uwolnionego i utlenionego żelaza w pierścieniu hemu, pasożyt stymuluje proces dimeryzacji jego cząsteczki i wytworzenie charakterystycznego, ciemnego, niezniszczalnego barwnika, czyli hemozoiny (Pagola i wsp., 2000).

Po kilkunastu cyklach rozmnażania bezpłciowego, część merozoitów wytworzonych w krwinkach czerwonych przekształca się w gametocyty, będące formą pasożyta inwazyjną dla komara, które dostają się do organizmu wektora wraz z wysysaną krwią człowieka. Proces gametocytoogenezy trwa, w zależności od gatunku pasożyta, od 4 do 10 dni. W jelicie komara komórki płciowe ulegają aktywacji do mikro- (gametocyty męskie) i makrogamet (gametocyty żeńskie), które łącząc się ze sobą tworząc zygotę. Zygota w postaci ookinety penetruje ścianę przewodu pokarmowego komara i otorbia się tworząc oocystę, w obrębie której dochodzi do licznych podziałów zarodźca i powstania tysięcy ruchomych sporozoitów. Po pęknięciu oocysty, sporozoity wędrują do gruczołów ślinowych komara oczekując kolejnego posiłku na żywicielu pośrednim (Ryc. 5). Proces rozmnażania płciowego w

ciele samicy komara trwa zwykle od 8 do 35 dni, w zależności od temperatury i wilgotności powietrza (Garnham, 1988; Warrell i Gilles, 2002).



Ryc. 5. Cykl rozwojowy zarodźców zimnicy chorobotwórczych dla człowieka. Wg Centers for Disease Control and Prevention (CDC, Atlanta) w modyfikacji własnej.

W rozprawie doktorskiej podjęto się oceny nieznaną dotąd częstości występowania poszczególnych gatunków zarodźca zimnicy w reprezentatywnej grupie polskich pacjentów z potwierdzoną malarią, leczonych i konsultowanych w Ośrodku Poznańskim, w zależności od kierunku i charakteru podróży oraz miejsca pobytu w strefie endemicznej.

## 1.5. Patogeneza i obraz kliniczny malarii u człowieka

Ostry rzut zimnicy trwa od 6 do 10 godzin i wywołany jest przez cytokiny prozapalne, takie jak TNF-alfa, IL-1, IL-8, IL-12 oraz IL-18, których produkcję i uwalnianie stymuluje GPI, czyli lipid wiążący białko powierzchniowe merozoitów (MSP-1), będący główną toksyną zarodźców. TNF-alfa uwalniany w dużych ilościach wywołuje u pacjenta uczucie zimna, dreszcze, ziębnięcie dystalnych części kończyn, silny ból głowy, wzrost temperatury ciała, a następnie masywne pocenie się i spadek temperatury z rozszerzeniem naczyń krwionośnych (Angulo i Fresno, 2002; Tchinda i wsp., 2007). Po ostrym epizodzie malarii, w przypadku pierwszego napadu, pacjent zapada zwykle w głęboki sen, aby po obudzeniu powrócić do normalnej aktywności fizycznej. Rozpad populacji zarażonych erytrocytów krwi obwodowej oraz wnikanie uwalnianych z nich merozoitów do kolejnych krwinek czerwonych w inwazji *P. vivax* i *P. ovale* pojawia się co trzeci dzień, dlatego tę postać zimnicy nazywa się historycznie „trzeciaczka”, a w inwazji *P. malariae* - co czwarty dzień, czyli ta forma malarii była w przeszłości określana jako „czwartaczka”. Aktualnie, ze względu na powszechne stosowanie leków przeciwmalarycznych, nie obserwuje się już zsynchronizowanego niszczenia erytrocytów przez pasożyta, które następowałyby cyklicznie co 48 lub 72 godziny, ani periodyczności i regularnej nawrotowości ostrych objawów zimnicy. Stąd każdy stan gorączkowy u pacjenta przebywającego w tropiku lub powracającego z obszarów strefy endemicznej powinien zawsze budzić podejrzenie malarii. Tor gorączkowy jest przeważnie nieregularny, wieloszczytowy, jak w przypadku inwazji *P. falciparum*, a w inwazji *P. knowlesi* napady gorączki pojawiają się u pacjenta codziennie (malaria „dwojaczka”).

Malaria od lat fascynowała wielu artystów, a jej niezwykle przejmujący obraz przebiegu klinicznego, będący inspiracją dla pisarzy zarówno historycznych, jak i współczesnych, zajmuje kluczową pozycję w opracowaniach polskiej literatury. Barwny opis cierpiącej na zimnicę głównej bohaterki, nie znającej granic czasu, słynnej powieści Henryka Sienkiewicza „W pustyni i w puszczy” jest aktualny aż do dnia dzisiejszego: *„Po czym (Staś) położył jej dłoń na czole, które było suche i zarazem lodowate. Więc porwał ją na ręce i poniósł ku ognisku.*

*- Zimno ci? – pytał po drodze.*

*- I zimno, i gorąco, ale bardziej zimno...*

*Jakoż ząbki jej uderzały jedno o drugie, a ciałem wstrząsały ciągle dreszcze. Staś nie miał już najmniejszej wątpliwości, że dostała febry. (...) Przy świetle kaganka zawieszono wewnątrz drzewa Staś dostrzegł jej błyszczące źrenice. Po chwili zaczęła się skarżyć na gorąco, a jednocześnie trzęsła się pod wołokami i pod pledem. Ręce jej i czoło były wciąż zimne, ale gdyby Staś znał się choć cokolwiek na febrycznych przypadłościach, byłby poznał z jej nadzwyczaj niespokojnych ruchów, że musi mieć straszliwą gorączkę. (...) Oczy Nel rozszerzały się coraz bardziej. Serce biło tak gwałtownie, iż zdawało się, że pęknie lada chwila. Potem zaczęła się rzucać jak ryba wyjęta z wody i trwało to prawie do rana. Dopiero nad samym ranem siły jej wyczerpały się zupełnie i główka opadła na postanie. (...) Staś w pierwszej chwili przeraził się okropnie, myślał bowiem, że umarła. Ale to był tylko koniec pierwszego paroksyzmu tej strasznej afrykańskiej febry, zwanej „zgubną”, której dwa ataki ludzie silni i zdrowi mogą przetrzymać; trzeciego nie przetrzymał dotychczas nikt. (...) Staś wiedział, że jedynym lekarstwem, jakie mogło przerwać lub pooddalać od siebie ataki, były duże dawki chininy, ale nie miał już jej ani atomu. (...) Ale teraz dopiero przy świetle dziennym można było dokładnie zobaczyć, jakie ta jedna noc gorączki porobiła w niej spustoszenia. Cerę miała żółtą i przezroczystą, usta poczerniałe, oczy podkrążone i twarzyczkę jakby postarzałą. (...) A tymczasem deszcz zlewał ziemię po kilkanaście razy na dzień, powiększając wilgoć powietrza”<sup>\*</sup>.*

Przebieg kliniczny malarii zależy głównie od gatunku zarodźca, który jest przyczyną inwazji, a spośród pięciu gatunków *Plasmodium* patogennych dla człowieka – zarodziec sierpowaty jest odpowiedzialny za najcięższe postaci choroby (Bruneel i wsp., 2010). Przebieg kliniczny malarii wywołanej przez *P. vivax*, *P. ovale* i *P. malariae* jest zdecydowanie łagodniejszy od przebiegu malarii wywołanej przez *P. falciparum*, określanej jako malaria złośliwa lub tropikalna. Przyczyną jej gwałtownego i ciężkiego przebiegu jest skomplikowany cykl zmian patofizjologicznych zachodzących we wszystkich narządach wewnętrznych, których podstawowym mechanizmem jest cytoadherencja, sekwestracja, rozetkowanie i agregacja zarażonych erytrocytów w drobnych naczyniach włosowatych. Inwazja krwinek czerwonych przez pasożyta powoduje zmianę białek powierzchniowych komórek i ekspresję nowych protein, takich jak np. PfEMP-1, Pfadhezyna, MESA, sekwetryna, które formują tzw. „guzki” i za pomocą cząsteczek adhezyjnych i

---

<sup>\*</sup> Henryk Sienkiewicz: W pustyni i w puszczy. Wydawnictwo GREG, Kraków, 2010.

antygeny CD36 ulegają adhezji do komórek śródbłona naczyń włosowatych (Miller i wsp., 2002; Kraemer i Smith, 2006). Międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna ICAM-1 jest głównym ligandem komórkowym warunkującym sekwestrację erytrocytów w naczyniach mózgowia, siarczan chondroityny w naczyniach łożyska, natomiast białko CD36 warunkuje cytoadherencję w naczyniach pozostałych narządów wewnętrznych. Zarażone erytrocyty wykazują tendencję do łączenia się z antygenem grupowym A, receptorem dopełniacza i innymi antygenami błonowymi krwinek niezrażonych, co nosi nazwę rozetkowania i dodatkowo nasila niedrożność w mikrokrążeniu. Rezultatem zaciopowania naczyń włosowatych jest niedostateczne utlenowanie tkanek, niedobór substancji odżywczych, upośledzenie transportu produktów przemiany materii i w konsekwencji anaerobowa glikoliza i kwasica mleczanowa w uszkodzonych komórkach, powodująca dysfunkcję ważnych dla życia tkanek i narządów. Również agregacja zarażonych erytrocytów z płytkami krwi, związana z ciężkim przebiegiem malarii, jest źródłem niedrożności drobnych naczyń krwionośnych w narządach wewnętrznych. Masywne gromadzenie antygenów *P. falciparum* w naczyniach włosowatych, formowanie i odkładanie kompleksów immunologicznych z zużyciem składowych komplementu C3 i C4 są odzwierciedleniem złożonych reakcji immunologicznych zachodzących w organizmie zarażonego żywiciela (Grau i wsp., 1990; Hunt i wsp., 2006; Warrell i Gilles, 2002). Zbliżony, ciężki przebieg kliniczny z wysoką parazytamią we krwi obwodowej i niewydolnością wielonarządową jest cechą charakterystyczną dla zoonotycznego zarodźca *P. knowlesi*. Podobnie jak w przypadku *P. falciparum*, gatunek ten nie wytwarza hypnozoitów, stąd też w przebiegu klinicznym nie obserwuje się odległych nawrotów choroby (Luchavez i wsp., 2008; Ng i wsp., 2008). Natomiast, ostrym powikłaniem malarii łagodnej, wywoływanej przez zarodźca ruchliwego i owalnego może być pęknięcie śledziony z przebiegiem od bezobjawowego do masywnego krwawienia z ryzykiem wstrząsu i zgonu, które zawsze wymaga pilnej interwencji chirurgicznej (Davies i Venkatesan, 2002; Hamel i wsp., 2002).

Krajowy rejestr przypadków malarii importowanych do Polski, prowadzony przez Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny w Warszawie nie uwzględnia charakteru przebiegu klinicznego choroby, ani stopnia ciężkości zarażenia. **W rozprawie doktorskiej przedstawiono szczegółowo cechy obrazu klinicznego i powikłania malarii w szerokiej grupie pacjentów hospitalizowanych lub konsultowanych w Klinice Chorób Tropikalnych i**



**Pasożytniczych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu na przestrzeni ostatnich 10 lat. Jest to do chwili obecnej największe zbiorcze opracowanie kliniczne dotyczące polskich pacjentów, powracających do kraju z potwierdzoną malarią, nabywaną podczas podróży do krajów odmiennej strefy geograficzno-klimatycznej.**

## **1.6. Zasady laboratoryjnego rozpoznawania malarii**

Kryteria kliniczne, takie jak śpiączka, drgawki, niewydolność nerek i układu oddechowego, objawy wstrząsu, czy krwawienia oraz kryteria laboratoryjne, do których należy np. ciężka niedokrwistość, hipoglikemia, cechy zespołu wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (DIC), kwasica metaboliczna, czy podwyższony poziom kreatyniny nie są specyficzne dla malarii i mogą wystąpić w przebiegu każdego uogólnionego zakażenia przebiegającego pod postacią posocznicy (sepsy), dlatego też obraz kliniczny pacjenta nie może decydować o ostatecznym rozpoznaniu choroby. Istnieje wiele nowoczesnych technik laboratoryjnych ukierunkowujących potwierdzenie zachorowania na zimnicę, do których należą: cytometria przepływowa, mikroskopia fluorescencyjna, automatyczne analizatory biochemiczne, metody molekularne, czy też spektrofotometria masowa (Hänscheid, 1999; Hänscheid i Valadas, 1999; Demirev i wsp., 2002; Magill, 2006; Tangpukdee i wsp., 2009). Niemniej jednak, złotym standardem diagnostycznym pozostaje nadal analiza grubej kropli i cienkiego rozmazu krwi obwodowej dla bezpośredniego wykrycia obecności zarodźca malarii w zarażonych erytrocytach za pomocą mikroskopu świetlnego. Procedura wykonania powyższych rozmazów krwi jest dość skomplikowana i bardzo czasochłonna, a analiza – niezwykle trudna i odpowiedzialna, co wymaga wysokich kwalifikacji i ogromnego doświadczenia pracownika laboratorium oceniającego preparaty krwi (Payne, 1988; Kain i Keystone, 1998; Coleman i wsp., 2002; Ngsala i wsp., 2008). Jednym z wielu argumentów świadczących jednak o wysokiej użyteczności tej metody diagnostycznej jest fakt, że jest to jedyne bezpośrednie badanie parazytologiczne, pozwalające na dokładne określenie odsetka zarażonych erytrocytów, który jest wykładnikiem ciężkości przebiegu klinicznego malarii, a także monitorowanie skuteczności działania leków przeciwmalarycznych.

Techniki molekularne, które cechują się najwyższą czułością diagnostyczną, nie mogą stać się metodą alternatywną, gdyż wysoki koszt, naukowa aparatura oraz

złożona technologia uniemożliwiają ich szerokie użycie nie tylko w ośrodkach podstawowej opieki zdrowotnej w odległych rejonach krajów strefy międzyzwrotnikowej, ale również w krajach rozwiniętych (Hänscheid i Valadas, 1999).

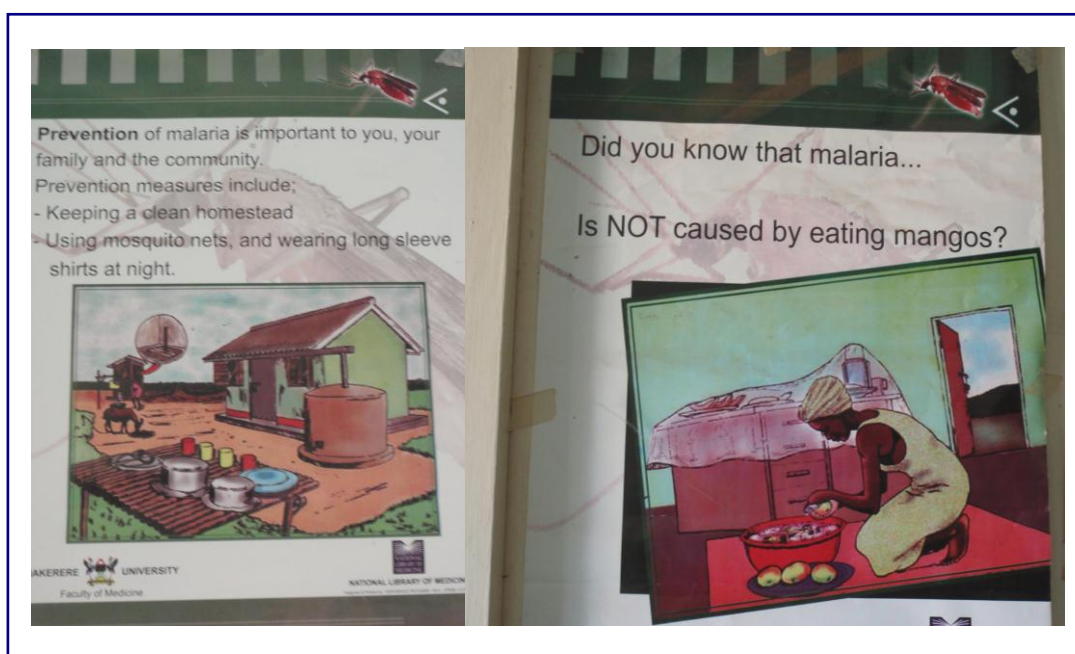
Wprowadzone w latach 90-tych ubiegłego wieku testy immunochromatograficzne, potwierdzające obecność antygenów *Plasmodium* spp. we krwi obwodowej pacjenta są szybkie i proste w wykonaniu, jednak posiadają znaczące ograniczenia, gdyż często nie rozróżniają gatunku zarodźca, zawodzą w przypadkach inwazji mieszanych i przebiegających z niską parazytamią, nie informują o intensywności zarażenia, a ich użyteczność w monitorowaniu skuteczności leczenia malarii jest niewielka (Murray i wsp., 2008; Murray i Bennett, 2009; Gillet i wsp., 2010; Kyabayinze i wsp., 2010; Singh i wsp., 2010; Wilson, 2012).

Kolejną metodą służącą rozpoznawaniu zimnicy są badania serologiczne służące do wykrywania swoistych przeciwciał przeciwmalarycznych. Ze względu na fakt, iż przeciwciała skierowane przeciwko *Plasmodium* spp. pojawiają się w późniejszej fazie choroby, odczyny serologiczne służą przeważnie do retrospektywnego potwierdzania zachorowania na malarię, np. u misjonarzy, żołnierzy misji stabilizacyjnych, wolontariuszy akcji humanitarnych, marynarzy, pilotów i imigrantów powracających z krajów endemicznego występowania malarii. Wykrywanie przeciwciał w kierunku zarodźca zimnicy we krwi obwodowej znalazło zastosowanie w badaniach przesiewowych dawców krwi, potencjalnie eksponowanych na zarażenie *Plasmodium* spp. (Seed i wsp., 2005; 2011).

Zimnica zbyt późno rozpoznana u osób podróżujących, nie posiadających częściowej odporności przeciwmalarycznej jest chorobą potencjalnie śmiertelną, bezpośrednio zagrażającą życiu i zdrowiu (WHO, 2000; Magill, 2006). **Stąd też poszukiwanie nowej, skutecznej metody określającej stopień ciężkości stanu klinicznego pacjentów i oceniającej efektywność prowadzonej terapii przeciw pasożytniczej oraz objawowej, skłoniło mnie do przeprowadzenia oryginalnych badań nad zastosowaniem wykrywania wybranych antygenów *Plasmodium* spp. dla obiektywnego rozpoznawania i bliższej oceny przebiegu klinicznego tej jednostki chorobowej oraz monitorowania skuteczności prowadzonego leczenia swoistego.**

## 1.7. Sposoby zapobiegania i zwalczania malarii

Zapobieganie malarii jest procesem złożonym i skomplikowanym, na który składają się: (i) kontrola przenosiciela, (ii) indywidualna profilaktyka dla osób przebywających w rejonach endemicznych, (iii) wprowadzanie w życie nowych metod diagnostycznych poprawiających racjonalność decyzji dotyczących kwalifikacji do leczenia, (iv) zwiększanie dostępności do opieki zdrowotnej, gwarantującej profesjonalne leczenie przeciw pasożytnicze oraz edukację społeczeństw żyjących w bezpośrednim zagrożeniu zimnicą oraz (v) zwiększanie świadomości zagrożenia wśród osób podróżujących do krajów strefy tropikalnej.



**Ryc. 6. Różne formy edukacji zdrowotnej w zakresie zapobiegania malarii dla mieszkańców strefy endemicznej. St. Francis Hospital w Bulubie (Uganda).**

Jednym z rozwiązań stosowanych w procesie kontroli i zwalczania zimnicy na świecie jest edukacja, dotycząca sposobów zapobiegania zarażeniu *Plasmodium* spp. (Ryc. 6), a także szeroki dostęp do chemioprophylaktyki przeciwmalarycznej. Istnieją dwa główne sposoby, które w istotny sposób zmniejszają ryzyko zachorowania na zimnicę. Pierwszym z nich jest pobieranie właściwych leków przeciwmalarycznych, jeszcze przed zachorowaniem, w ramach profilaktyki farmakologicznej, które zaleca się osobom przebywającym okresowo w rejonach endemicznego występowania zimnicy (Petersen, 2004; Freedman, 2008;

Schlagenhauf i Petersen, 2008). Wybór skutecznych preparatów przeciwmalarycznych powinien być dokonywany indywidualnie dla każdego pacjenta, w zależności od kierunku i trasy podróży, warunków klimatyczno-środowiskowych, celu i charakteru wyjazdu, długości pobytu w tropiku oraz poziomu dotychczasowej odporności przeciwmalarycznej, np. u misjonarzy, marynarzy i lotników długotrwale przebywających w strefie endemicznego występowania malarii. Ze względu na gwałtownie narastającą oporność na stosowane dotąd leki przeciwmalaryczne, szczególnie na chlorochinę oraz pirymetaminę i jej połączenie z sulfadiazyną (Fansidar), zalecenia dotyczące skutecznej, farmakologicznej profilaktyki przeciwmalarycznej dla osób podróżujących do strefy endemicznej zmieniają się co kilka lat. Zgodnie z aktualnymi zaleceniami Światowej Organizacji Zdrowia, do leków stosowanych zapobiegawczo na obszarach o wysokiej chlorochinooporności należą: doksycyklina, meflochina lub połączenie atowakwonu z proguanilem (Malarone). Fansidar, który był szeroko używany w postaci „leku w kieszeni” w momencie pojawienia się objawów klinicznych malarii, podczas pobytu w strefie tropikalnej, został już całkowicie wyparty przez połączenie artemeteru z lumefantryną (Co-artem, Riamet) lub Malarone.

Kolejną metodą chroniącą przed malarią jest stosowanie barier mechanicznych w postaci repelentów, moskitier oraz odpowiedniej odzieży ochronnej zalecanej po zachodzie słońca (długie spodnie, koszule z długimi rękawami, grube skarpety, nakrycie głowy), chroniących przed ukłuciami komarów, które są podstawową formą obrony przed zimnicą dla ludności mieszkającej na stałe w krajach tropikalnych (Rehman i wsp., 2011). Zapobieganie zimnicy jest bardzo trudne, ponieważ żadna forma profilaktyki nie jest w pełni skuteczna, ani całkowicie bezpieczna, a duża zmienność antygenowa pasożyta oraz mnogość form rozwojowych w ustroju żywiciela uniemożliwiają osiągnięcie zadowalających efektów w badaniach nad opracowaniem efektywnej szczepionki dla człowieka.

**W pracy zestawiono dane dotyczące farmakologicznej profilaktyki przeciwmalarycznej u pacjentów Ośrodka Poznańskiego, powracających z rejonów strefy międzyzwrotnikowej i subtropikalnej z udokumentowanym zarażeniem *Plasmodium* spp. i omówiono najczęstsze błędy w jej stosowaniu. Dokonano bliższej analizy dostrzeganych nieprawidłowości w zakresie przestrzegania zasad profilaktyki zdrowotnej w krajach strefy gorącej oraz**

**sprzyjających zarażeniu czynników środowiskowych, w aspekcie ich wpływu na ryzyko wystąpienia bezpośrednio zagrażającej życiu zimnicy.**

Najstarszym sposobem walki z wektorem była eliminacja siedlisk lęgowych komarów przez osuszanie terenów podmokłych. Obecnie stosuje się toksyny bakteryjne i związki chemiczne, które wprowadza się do zbiorników wodnych. Ważne jest także, aby nie budować domów w pobliżu miejsc lęgu komarów, dbać o właściwą konstrukcję sufitów, by nie dawały one schronienia komarom, które przebywają w zamkniętych przestrzeniach (np. *Anopheles stephensi* w Indiach) oraz eliminować zbiorniki wody stojącej, uformowane w sposób sztuczny, takie jak otwarte butelki i puszki po napojach, czy też zużyte opony samochodowe (Ryc. 7).



**Ryc. 7. Pozostawione pojemniki na wodę do pojenia zwierząt gospodarskich czynnikiem sprzyjającym namnażaniu się komarów przenoszących zarodźce zimnicy. Rejon Kyenjojo w Ugandzie (Afryka).**

Mechaniczne bariery chroniące przed ukłuciami samic komarów w postaci moskitier i siatek w oknach i drzwiach wykazują dużą skuteczność wtedy, gdy ich wielkość i średnica otworów są odpowiednie, gdy są używane przez większość osób w lokalnej populacji i uwzględniają pory największej aktywności komarów. Mimo, iż koszt moskitier jest dość wysoki, wiele rządów krajów afrykańskich wprowadziło współfinansowanie mechanicznych środków ochrony przed komarami na szeroką skalę i dzięki temu spowodowało ogólną redukcję liczby zgonów nawet o 20% (Lengeler i wsp., 1997). Jeszcze większą skuteczność wykazują moskitiery i siatki impregnowane środkiem owadobójczym, którym najczęściej jest permetryna (ITNs – ang. *Insecticide Treated Nets*). Aktualne analizy wykazują, iż wśród mechanicznych barier chroniących przed ukłuciami komarów, najwyższą efektywność posiadają siatki ochronne ze środkiem owadobójczym o przedłużonym działaniu LLINs (ang. *Long-Lasting Insecticide Treated Nets*), które pozostają aktywne przez wiele lat (Lindblade i wsp., 2005; Blackburn i wsp., 2006) (Ryc. 8). Dzięki wysiłkom Światowej Organizacji Zdrowia i miejscowych służb sanitarnych, odsetek domostw wyposażonych w co najmniej jedną moskitierę zwiększył się z 3% w roku 2000, do aż 50% w roku 2011. Badania epidemiologiczne wykazały, iż 96% mieszkańców strefy tropikalnej posiadających moskitiery impregnowane insektycydem, rzeczywiście je stosuje. Liczba moskitier nasączonych środkiem owadobójczym o przedłużonym działaniu, rozprowadzanych w rejonach endemicznych w Afryce, wzrosła z 88,5 mln w roku 2009 do 145 mln w roku 2010 (WHO, 2011a).

Środki owadobójcze niszczące postaci dorosłe komarów są także szeroko stosowane do spryskiwania pomieszczeń mieszkalnych w ramach programu IRS Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *Indoor Residual Spraying*) (Kleinschmidt i wsp., 2009). W chwili obecnej, środki owadobójcze chronią 185 mln osób, co stanowi około 6% populacji zamieszkującej tereny ryzyka, a liczba Afrykańczyków chronionych przez preparaty rozpylane wewnątrz domów zwiększyła się z 10 mln w roku 2005 do 78 mln w roku 2010 (WHO, 2011a). Najczęściej stosowane insektycydy należą do 3 grup związków chemicznych: pyretroidów, chlorowanych węglowodorów (DDT i gamma-HCH) i organicznych fosforanów. Insektycydy pozostają jedynym narzędziem do walki z zimnicą w wielu rejonach tropikalnych, mimo, iż wiele gatunków komarów wykształciło już na nie oporność (WHO, 2007; Chanda i wsp., 2011). Ponadto, mogą one wywierać efekt toksyczny na osoby zaangażowane w ich rozpylanie oraz na lokalną faunę i florę tropikalną, która żyje w otoczeniu spryskiwanych domostw. Do



nowoczesnych, biologicznych sposobów niszczenia przerosiciela zarodzców malarii, nie powodujacych skażenia środowiska naturalnego, nalezy hodowla ryb komarozernych np. *Gambusia affinis* w zbiornikach wodnych bedacych naturalnym siedliskiem komarow *Anopheles* spp. oraz stosowanie bioinsektycydow wytwarzanych przez niektore bakterie (np. *Bacillus thuringiensis*).



**Ryc. 8. Moskitiera nasaczona sredkiem owadobojczym oraz siatki w oknach skutecznie chronia w porze nocnej przed ukucziami komarow przenoszacych malarie. Kampus uniwersytecki w *Kilimanjaro Cristian Medical Centre*, Moshi (Tanzania).**

Kolejnym sposobem zmniejszajacym ryzyko ukuczcia komara sa sredki odstraszacze owady czyli repelenty. Najczesciej stosowanym zwiazkiem jest dietyleno-toluamid (DEET) (Ryc. 9). Repelenty sa skuteczne, gdy sa nanoszone na odkryte czesci ciała wielokrotnie w ciagu doby. Czeste stosowanie repelentow zawierajacych DEET nie stanowi ryzyka dla zdrowia i jest bezpieczne nawet dla kobiet w ciazy (McGready i wsp., 2001).

Krokiem milowym w ograniczaniu liczby zachorowan na malarie w rejonach endemicznych, okazalo sie szerokie wprowadzenie pochodnych artemizyny jako leku pierwszego rzutu w leczeniu objawowej zimnicy, w polaczeniu z innym lekiem przeciwmalarycznym w ramach terapii skojarzonej ACT (ang. *Artemisinin-based Combination Therapy*). Preparaty artemizyny stosowane do niedawna w postaci

monoterapii zostały całkowicie wycofane z użycia przez Światową Organizację Zdrowia (Hutagalung i wsp., 2005; Whitty i wsp., 2008; Sykes i wsp., 2009; Nadjm i wsp., 2010). W 2011 roku, 84 państwa zaadoptowały leczenie skojarzone oparte na artemizynie, jako terapię pierwszego rzutu w niepowikłanych przypadkach malarii wywoływanej przez *P. falciparum* lub w zarażeniach *P. vivax* opornych na chlorochinę. Doniesienia o pojawianiu się oporności na artemizynę w dorzeczu Mekongu na Półwyspie Indochińskim (Tajlandia, Kambodża, Wietnam, Myanmar) zmuszają do dalszych wysiłków nad poszukiwaniem nowych, skutecznych leków przeciwmalarycznych (WHO, 2011a; Phyo i wsp., 2012).



**Ryc. 9. Środek odstrasżający komary (repelent) do stosowania na skórę, zawierający 50% stężenie dietylenotoluamidu (Mugga). Kolekcja własna.**

Następnym wyzwaniem dla zwalczania malarii na obszarach ryzyka jest stosowanie tzw. przerywanego leczenia profilaktycznego (IPT - ang. *Intermittent Preventive Treatment*) w grupach szczególnie narażonych na zachorowanie, czyli u kobiet ciężarnych i małych dzieci. Program polega na podawaniu 2-3 dawek pirymetaminy z sulfadiazyną (Fansidar) podczas wizyt kontrolnych w ramach opieki prenatalnej lub w skojarzeniu z narodowym programem szczepień ochronnych (Blackburn i wsp., 2006; WHO, 2011a). Zaleceniem chemioprophylaktyki



przeciwmalarycznej kobiet ciężarnych objętych jest aktualnie 35 spośród 45 krajów Afryki Subsaharyjskiej, Papua-Nowa Gwinea oraz wyspy Zachodniego Pacyfiku, ale odsetek pacjentek otrzymujących profilaktycznie leki w czasie ciąży waha się nadal w dość szerokich granicach, np. od 4% w Namibii do prawie 70% w Zambii. Natomiast do końca 2011 roku, żadne z państw endemicznych nie wywiązało się jeszcze z obowiązku wprowadzenia 3 dawek chemioprophylaktycznych Fansidaru dla niemowląt i najmłodszych dzieci, w połączeniu ze szczepieniami ochronnymi w kierunku tężca, błonicy, krztuśca i odry (WHO, 2011a).

Nową formą zapobiegania malarii u starszych dzieci jest stosowanie tzw. chemioprophylaktyki sezonowej (SMC, ang. *Seasonal Malaria Chemoprevention*), która polega na podawaniu pełnej dawki terapeutycznej skutecznego na danym obszarze geograficznym leku przeciwmalarycznego, w okresie najwyższego ryzyka zachorowania na malarię. Celem projektu, jest utrzymanie odpowiedniego stężenia leku we krwi podczas całego okresu nasilonego zagrożenia, w celu prewencji rozwoju objawowej postaci choroby (WHO, 2011a).

Oczekiwana, skuteczna szczepionka przeciwmalaryczna, byłaby cennym uzupełnieniem zestawu działań profilaktycznych w kierunku malarii, a jej szerokie upowszechnienie jest najbardziej priorytetowym wyzwaniem dla medycyny tropikalnej XXI wieku. W chwili obecnej, najbardziej wartościowym kandydatem do produkcji szczepionki wydaje się być białko RTS,S/AS01, które jest połączeniem antygenu sporozoitów *P. falciparum* z białkiem powierzchniowym wirusa HBV. Prowadzone badania znajdują się w trzeciej fazie prób klinicznych, a ich ukończenie jest planowane na rok 2015. Światowa Organizacja Zdrowia zamierza uzyskać poziom co najmniej 80% skuteczności szczepionki w zakresie zapobiegania objawowej malarii do końca 2015 roku, a następnie dopracować strategię szczepionki przerywającej transmisję zarażenia w środowisku (The RTS,S Clinical Trials Partnership, 2011; Whitty, 2011; WHO, 2011a).

Mimo stałych wysiłków rządów krajów rozwijających się oraz przedsięwzięć w ramach międzynarodowych programów zwalczania i kontroli malarii na świecie, wobec szerokiego rozprzestrzenienia geograficznego i ciągle pojawiających się nowych wyzwań i trudności w procesie diagnostyki i leczenia, zimnica pozostaje nadal jednym z głównych problemów medycznych i ekonomicznych wielu społeczności zamieszkujących rejony endemiczne (Majori, 2000; Suh i wsp., 2004; Brasseur i wsp., 2011; WHO, 2011a).

## 1.8. Aktualne możliwości leczenia malarii

Ustalenie schematu leczenia malarii jest bardzo trudne, gdyż wymaga uwzględnienia wielu czynników, które kształtują się indywidualnie u każdego pacjenta. Do najważniejszych z nich należą: gatunek zarodźca zimnicy, wielkość parazytemii we krwi obwodowej oraz rejon pochodzenia inwazji, wpływający na lekooporność pasożytów. W doborze właściwej terapii przeciwpasożytniczej, nie można także pominąć danych o występowaniu chorób przewlekłych, które stanowią dodatkowe obciążenie modyfikujące stan immunologiczny chorego i mogą w znaczny sposób wpływać na przebieg zimnicy, zwiększając w istotny sposób ryzyko ciężkich powikłań i zgonu. Choroby współistniejące są częstym przeciwwskazaniem do stosowania określonych grup leków przeciwmalarycznych. Ze względu na stale zwiększającą się oporność zarodźca zimnicy na leki, aktualne zalecenia dotyczące leczenia malarii stanowią o konieczności zastąpienia monoterapii leczeniem skojarzonym (Sykes i wsp., 2009; Nadjm i wsp., 2010; WHO, 2011a). Takie postępowanie zwiększa szanse sukcesu terapeutycznego, ale z drugiej strony - generuje także ryzyko wystąpienia efektów ubocznych terapii. Leczenie skojarzone wymaga większych nakładów finansowych, co może jeszcze bardziej ograniczać dostęp do leków w odległych rejonach krajów endemicznego występowania zimnicy. Najczęściej stosuje się wielolekową terapię skojarzoną, opierającą się na połączeniach pochodnych artemizyny z lumefantryną, amodiachiną, meflochiną, doksycyliną lub sulfadoksyną i pirymetaminą (Dzbeński i wsp., 2009).

Ze względu na niezwykle szybko postępujące objawy chorobowe, istotne ryzyko wystąpienia niewydolności wielonarządowej i powikłań, a także nieustannie zmieniającą się i pogłębiającą oporność na leki przeciwmalaryczne, leczenie ciężkich przypadków zimnicy powinno odbywać się w referencyjnych ośrodkach medycyny tropikalnej, posiadających udokumentowane, praktyczne doświadczenie kliniczne w tym zakresie oraz stały dostęp do możliwości monitorowania podstawowych funkcji życiowych pacjenta (Stefaniak, 2004; Stefaniak i Paul, 2010). Gwałtowny przebieg kliniczny choroby oraz bardzo złożony zespół mechanizmów patogenetycznych w malarii, istotne ryzyko dysfunkcji wielonarządowej, podobnie jak w przebiegu posocznicy (sepsy), a także bezwzględne przeciwwskazania do podawania wielu leków rutynowo stosowanych w codziennej praktyce internistycznej powodują, iż leczenie przypadków malarii jest procesem niezwykle trudnym i skomplikowanym. **W**

rozprawie doktorskiej dokonano pełnego zestawienia różnorodnych sposobów terapii przeciwmalarycznej, stosowanych w grupie pacjentów hospitalizowanych w Klinice Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Podjęto się po raz pierwszy przeprowadzenia próby wykorzystania oznaczeń swoistych antygenów *Plasmodium* spp. we krwi obwodowej dla oceny wrażliwości na zastosowane leki i monitorowania skuteczności prowadzonego, swoistego leczenia przeciw pasożytniczego, które są niezwykle istotne w codziennej praktyce specjalisty medycyny tropikalnej.

### **1.8.1. Chlorochina**

Chlorochina jest związkiem chemicznym należącym do grupy 4-amino-chinolinów, który wykazuje działanie schizontobójcze w inwazjach wrażliwych szczepów *P. vivax*, *P. ovale* i *P. malariae* oraz aktywność gametocytobójczą. Mechanizm działania chlorochiny polega na hamowaniu powstawania hemozyny przez blokowanie polimeryzacji hemu, który powstaje w wyniku proteolizy hemoglobiny w zarażonych erytrocytach. Bezpośrednim skutkiem zastosowania chlorochiny jest powstanie hematyny zawierającej utleniony jon żelaza, który jest toksyczny dla pasożyta (Sullivan i wsp., 1998). Chlorochina była przez kilkadziesiąt lat podstawowym lekiem przeciwmalarycznym, gdyż oprócz silnego działania przeciwpirotniaczego wykazywała również właściwości przeciwzapalne i przeciwgorączkowe. W ostatnim czasie, narastająca lekooporność *P. falciparum* znacznie ograniczyła stosowanie chlorochiny i zawężyła je do przypadków zimnicy wywołanej przez inne gatunki zarodźców. Częstymi objawami ubocznymi są reakcje alergiczne, fotodermatozy, przebarwienia skóry i błon śluzowych, a także zaburzenia żołądkowo-jelitowe i parestezje słuchowe. Stosowanie chlorochiny może spowodować zaburzenia w elektrokardiogramie w postaci poszerzenia zespołu QRS i wydłużenia odstępu QT, które sugerują zapalenie mięśnia sercowego. Po stosowaniu leku przez okres dłuższy niż 5 lat mogą pojawić się powikłania okulistyczne, takie jak: zwyrodnienie plamki żółtej i zapalenie siatkówki o charakterze *retinitis pigmentosa* z następczą utratą wzroku, zmętnienie rogówki oraz zaburzenia akomodacji oka. Z tego właśnie powodu, chlorochina została wycofana w ostatnich latach z programu tzw. przerywanego leczenia przeciwmalarycznego kobiet ciężarnych i małych dzieci,

stosowanego prewencyjnie w rejonach endemicznego występowania malarii w Afryce.

### **1.8.2. Amodiachina**

Amodiachina, podobnie jak chlorochina, należy do związków chemicznych z grupy 4-aminochinolinów. Ze względu na mnogie efekty niepożądane w postaci nudności, wymiotów, świądu skóry, bradykardii oraz zapalenia wątroby o gwałtownym przebiegu, szerokie stosowanie amodiachiny zostało zawężone do leczenia zimnicy u dzieci w rejonach hiperendemicznych, w przypadku braku dostępności do innych preparatów (Olliaro i wsp., 1996). Leczenie malarii amodiachiną dość znacznie zwiększa ryzyko agranulocytozy.

### **1.8.3. Chinina**

Chinina jest najstarszym lekiem przeciwmalarycznym na świecie i jednocześnie najszersze stosowanym w terapii zimnicy. Jest ona wytwarzana z kory drzewa chinowego (*Cinchona* spp.), którego naturalne plantacje wywodzą się z Ameryki Południowej. Substancja była od wieków stosowana w inkaskiej kulturze Indian peruwiańskich jako lek przeciwgorączkowy; do dnia dzisiejszego godło Peru zawiera symbol drzewa chinowego. Chinina wykazuje działanie schizontobójcze na formy krwinkowe wszystkich gatunków *Plasmodium* chorobotwórczych dla człowieka, a efekt leczniczy pojawia się bardzo szybko od momentu włączenia leczenia. Mechanizm działania leku opiera się na blokowaniu oddychania komórkowego pasożyta przez uszkodzenie enzymów oksydoredukcyjnych, hamowaniu funkcji lizosomów i tworzeniu kompleksów z kwasem nukleinowym pasożyta.

Chininę stosuje się w leczeniu ciężkich postaci malarii, często w postaci wlewu kroplowego u pacjentów nieprzytomnych; jest również bezpieczna u kobiet ciężarnych i małych dzieci. Do głównych objawów niepożądanych należą tachyarytmie oraz spadki ciśnienia tętniczego krwi, które wynikają z faktu, że chinina jest izomerem chinidyny. Chinidyna jest lekiem antyarytmicznym, który wydłuża czas potencjału czynnościowego komórki mięśnia serca i zwiększa przewodzenie przez węzeł przedsionkowo-komorowy. W przypadku stosowania chininy mogą pojawić się także zaburzenia krzepnięcia krwi oraz znaczna hipoglikemia, którą powoduje zwiększone wydzielanie insuliny, wywołane stymulacją komórek beta trzustki przez

lek. Ze względu na małe różnice ilościowe pomiędzy dawkami terapeutycznymi i toksycznymi, leczenie chininą powinno odbywać się w ośrodkach wysokospecjalistycznych, często w ramach oddziałów intensywnej opieki medycznej (Bruneel i wsp., 2010; Stefaniak i Paul, 2010).

#### **1.8.4. Antagoniści kwasu foliowego**

Przedstawicielem grupy antagonistów kwasu foliowego jest, często stosowany w krajach afrykańskich, preparat Fansidar (*Roche*), będący połączeniem pirymetaminy i sulfadoksyny, w dawkach odpowiednio 25 i 500 mg. Mechanizm działania tej grupy leków polega na zahamowaniu reduktazy dihydrofolianowej i blokowaniu przemiany kwasu dwuhydrofoliowego do kwasu czterehydrofoliowego (folinowego). Rezultatem działania leku jest przerwanie syntezy kwasów nukleinowych *Plasmodium* spp. Połączenie leku z sulfonamidami, które posiadają ten sam punkt uchwytu w przemianach zasad purynowych, skutkuje zwiększeniem efektu działania przeciw pasożytniczego. Podczas stosowania leku dość często pojawiają się alergiczne wysypki skórne, a przyjmowany długotrwale może wywoływać leukopenię, agranulocytozę i trombocytopenię. Do najgroźniejszych, obciążonych niekorzystnym rokowaniem klinicznym objawów ubocznych, należy zespół Stevensa-Johnsona oraz zespół Lyella. Przed laty, używano Fansidaru do samodzielnego leczenia malarii w przypadku pojawienia się epizodu gorączki podczas podróży tropikalnej, w formie tzw. „leku w kieszeni”. Preparat ten nie jest aktualnie zalecany w leczeniu zimnicy, ani w profilaktyce u osób podróżujących ze względu na znaczną i bardzo szybką powstałą lekooporność.

#### **1.8.5. Meflochina**

Meflochina (*Lariam, Roche*) jest bardzo skutecznym lekiem przeciwmalarycznym, który działa na wszystkie gatunki *Plasmodium*, w tym szczepy *P. falciparum* odporne na chlorochinę i Fansidar. Należy do grupy 4-chinolino-karbaminoamin, a jej mechanizm działania polega na hamowaniu polimeryzacji hemu monomerycznego, co prowadzi do nagromadzenia toksycznej dla pasożytów hematyny. Ze względu na szerokie stosowanie leku w profilaktyce, pojawiły się szczepy zarodźców niewrażliwe na meflochinę, przede wszystkim na Półwyspie Indochińskim, na terenach Tajlandii graniczących z Laosem, Birmą (Myanmar) i Kambodżą, które są szczególnie

niebezpieczne dla podróżujących (Hutagalung i wsp., 2005; Schlagenhauf i Petersen, 2008). Przeciwwskazaniem do stosowania meflochiny są organiczne i czynnościowe zaburzenia neurologiczne i psychiatryczne, gdyż w grupie osób predysponowanych stosunkowo często pojawiają się: zaburzenia snu, obniżenie nastroju, drażliwość, napady lęku lub agresji oraz psychozy. Meflochina wchodzi w liczne i silne interakcje z innymi lekami powodując m.in. zaburzenia rytmu serca w przypadku jednoczesnego stosowania z beta-blokerami, antagonistami wapnia, blokerami receptora H1 i lekami przeciwmalarycznymi o podobnej budowie chemicznej. Stosowanie meflochiny powoduje zwiększenie ryzyka uogólnionych drgawek poprzez zmniejszanie stężenia w surowicy leków przeciwpadaczkowych, takich jak kwas walproinowy, czy karbamazepina.

### **1.8.6. Artemizyna i jej pochodne**

Artemizyna jest lekiem przeciwmalarycznym uzyskiwanym z liści krzewu Qinghao (*Artemisia annua*), stosowanym w chińskiej medycynie ludowej do leczenia stanów gorączkowych już od ponad 1500 lat (Ryc. 10). Sama artemizyna jest słabo rozpuszczalna w wodzie i tłuszczach, dlatego szersze stosowanie znalazły jej związki pochodne. W praktyce klinicznej stosuje się syntetyczne pochodne artemizyny, czyli artemeter, arteeter i artesunat. Dużą skuteczność działania przeciwpirotniaczego, artemizyna zawdzięcza mechanizmowi działania związanemu z produkcją wolnych rodników tlenowych, które uszkodzają błony komórkowe pasożytów, wysoką koncentracją leku we wnętrzu cytoplazmy pasożyta oraz niewielką lekoopornością *Plasmodium* spp. Pochodne artemizyny podaje się jako iniekcje domięśniowe, dożylnie lub czopki doodbytnicze w leczeniu ciężkich postaci malarii wywołanych przez wielolekooporne szczepy *P. falciparum* oraz w postaci doustnej w przypadku malarii wywołanej przez wielolekoporne szczepy *P. falciparum* o przebiegu niepowikłanym. W ostatnich latach, terapia oparta o parenteralne preparaty artemizyny została dopuszczona do leczenia ciężkich postaci powikłanej malarii, jako metoda alternatywna dla chininy (Jelinek, 2005; Dondorp i wsp., 2010). Efekty niepożądane związane z pobieraniem artemizyny i jej pochodnych występują bardzo rzadko. Artemizyna, ze względu na krótki okres półtrwania w surowicy nie może być stosowana w profilaktyce zimnicy.

### **1.8.7. Połączenie atowakwonu z proguanilem**

Atowakwon i proguanil tworzą preparat Malarone (*GlaxoSmithKline*), który wykazuje skuteczne działanie przeciw pasożytnicze poprzez zaburzenie transportu elektronów w mitochondriach i zmniejszenie syntezy kwasów nukleinowych zarodźców. Każda tabletkę zawiera 250 mg atowakwonu i 100 mg chlorowodoru proguanilu. Preparat może być stosowany zarówno w profilaktyce jak i leczeniu zimnicy. Ze względu na zdolność całkowitego hamowania schizogonii wątrobowej pasożytów, czas jego stosowania przed i po powrocie z rejonów malarycznych w ramach chemio profilaktyki, jest znacznie krótszy w porównaniu do innych leków przeciwmalarycznych (Petersen, 2004; Freedman, 2008). Główne efekty uboczne, które mogą wystąpić podczas pobierania leku to dolegliwości żołądkowo-jelitowe oraz bóle głowy. Efekty uboczne w postaci retinopatii obserwowanej po użyciu chlorochiny, zaburzenia funkcji ośrodkowego układu nerwowego notowane po zastosowaniu meflochiny czy zmiany skórne i reakcje fototoksyczne występujące u podróżnych stosujących doksycyklinę w przypadku zastosowania atowakwonu z proguanilem nie występują. Lek jest natomiast teratogenny i nie może być zalecany dla kobiet ciężarnych oraz w okresie karmienia.

### **1.8.8. Antybiotyki o działaniu przeciwpiętociowym**

Doksycyklina jest półsyntetycznym antybiotykiem z grupy tetracyklin, który wśród antybiotyków jest najczęściej stosowany w zapobieganiu i leczeniu malarii. Wykazuje działanie schizontobójcze na *P. vivax* oraz oporne na chlorochinę i meflochinę szczepy *P. falciparum*. Mechanizm działania leku polega na blokowaniu syntezy białka pasożyta przez łączenie się z rybosomem 3ps. Doksycyklinę stosuje się często w połączeniu z chininą lub chinidyną w leczeniu ciężkiej malarii, natomiast nie zaleca się jej stosowania w monoterapii. Przeciwwskazaniem do stosowania doksycykliny jest okres ciąży i karmienia oraz wiek do 8 roku życia, które wynikają z niekorzystnego wpływu antybiotyku na rozwój uzębienia i kości. Alternatywą w skojarzonym leczeniu malarii u kobiety ciężarnej może być np. klindamycyna. Kolejnym antybiotykiem wykazującym działanie schizontobójcze jest azytromycyna, której mechanizm działania polega również na blokowaniu syntezy białek pasożyta w rybosomach (Cook i Zumla, 2009).



Ryc. 10. Plantacja bylicy jednorocznej (*Artemisia annua*) w Fort Portal (Uganda).

### **1.8.9. Prymachina i tafenochina**

Prymachina (Primaquine, *Sanofi Aventis*) jest lekiem należącym do 8-aminochinolinów, który jako jedyny w grupie leków przeciwmalarycznych wykazuje aktywność przeciwko hypnozoitom wątrobowym w inwazjach *P. vivax* i *P. ovale*. Mechanizm działania prymachiny opiera się na uszkodzeniu błony mitochondrium pierwotniaka oraz tworzeniu kompleksów z hemem. Do objawów przedawkowania leku zalicza się kurczowe bóle brzucha, nudności i wymioty, objawy ze strony układu krążenia i układu nerwowego. Do ciężkich powikłań stosowania prymachiny należą agranulocytoza i hemoliza, które są szczególnie nasilone u osób z niedoborem dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej. Ze względu na ryzyko wystąpienia powikłań, leku nie zalecano zwykle w chemioprophylaktyce zimnicy, a jedynie celem eradykacji pasożyta w inwazjach *P. vivax* i *P. ovale* dla zapobieżenia odległym nawrotom choroby. Przeprowadzone niedawno badania kliniczne wykazały, iż prymachina może być stosowana bezpiecznie również w formie profilaktyki, nawet przez okres 12-52 tygodni (Warrell i Gilles, 2002; Baird i wsp., 2003). Tafenochina jest nowszą pochodną prymachiny.



## **2. CELE PRACY**

Zespół wielokierunkowych badań epidemiologicznych, klinicznych, parazytologicznych i immunodiagnostycznych przeprowadzono dla:

- 1. Określenia częstości występowania malarii wśród pacjentów gorączkujących po powrocie z obszarów endemicznych, hospitalizowanych w Klinice Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu;**
- 2. Oceny przebiegu klinicznego malarii u osób podróżujących do rejonów odmiennej strefy klimatyczno-środowiskowej i sanitarno-higienicznej, leczonych i konsultowanych w Ośrodku Poznańskim;**
- 3. Określenia wartości diagnostycznej metod wykrywających antygeny zarodźca zimnicy we krwi obwodowej dla rozpoznawania malarii u polskich pacjentów powracających z krajów endemicznych strefy gorącej;**
- 4. Analizy możliwości wykorzystania oznaczeń antygenów *Plasmodium* spp. we krwi obwodowej dla oceny klinicznej i prognostycznej pacjentów z malarią, importowaną do kraju z obszarów tropikalnych i subtropikalnych.**

## **3. MATERIAŁ I METODY**

### **3.1. Sposób przeprowadzenia badań**

Badania epidemiologiczno-kliniczne przeprowadzono w Katedrze i Klinice Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, która zlokalizowana jest na terenie Szpitala Klinicznego im. Heliodora Świącickiego przy ulicy Przybyszewskiego 49 (Kierownik Katedry: Prof. dr hab. med. Jerzy Stefaniak). Mikroskopowe i immunodiagnostyczne badania laboratoryjne przeprowadzono w Pracowni Diagnostyki Parazytologicznej Centralnego Laboratorium Mikrobiologicznego Szpitala (Kierownik: Dr Hanna Tomczak) oraz w Pracowni Parazytologicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, które mieści się w Katedrze Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych. Kierownikiem Laboratorium Uniwersyteckiego, który nadzorował przeprowadzenie badań była Dr hab. n. med. Małgorzata Paul.

Klinika Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych w Poznaniu pełni stały, 24-godzinny dyżur w zakresie chorób egzotycznych i inwazji pasożytniczych importowanych z krajów odmiennej strefy środowiskowo-klimatycznej i sanitarno-higienicznej, a w szczególności bezpośrednio zagrażającej życiu malarii. Katedra i Klinika Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych w Poznaniu jest aktualnie jednym z trzech krajowych ośrodków referencyjnych w dziedzinie medycyny tropikalnej w Polsce i konsultuje wszystkich pacjentów podejrzanych o zachorowanie na pasożytniczą chorobę tropikalną, którzy pochodzą z zachodnich i południowych obszarów kraju. Konsultacje odbywają się w trybie planowym w przypadku braku ostrych objawów u pacjenta lub w trybie nagłym w Centralnej Izbie Przyjęć Szpitala, gdzie lekarz specjalista medycyny morskiej i tropikalnej kwalifikuje chorych do hospitalizacji w Klinice w trybie natychmiastowym. Kwalifikacja do przyjęcia opiera się na dokładnej ocenie stanu ogólnego pacjenta i zaobserwowaniu ostrych objawów klinicznych świadczących o istotnym ryzyku zagrożenia zdrowia i życia oraz analizie ogólnych badań laboratoryjnych i specjalistycznych badań parazytologicznych. Do wysoce specjalistycznych badań parazytologicznych, które wykonuje się najczęściej u osób podróżujących, powracających z krajów strefy międzyzwrotnikowej i subtropikalnej, należy analiza mikroskopowa preparatów grubej kropli i cienkiego rozmazu krwi obwodowej, ostatecznie potwierdzająca zachorowanie na zimnicę. Powyższe badania wykonuje doświadczony diagnosta laboratoryjny w Pracowni Diagnostyki

Parazytologicznej Szpitala, który pełni 24-godzinny dyżur telefoniczny i na wezwanie lekarza dyżurnego przyjeżdża do Izby Przyjęć Szpitala. W przypadku potwierdzenia zachorowania na zimnicę, pacjent w trybie natychmiastowym zostaje przekazany do Kliniki i poddany leczeniu celowanemu, zgodnemu z aktualnymi wytycznymi Światowej Organizacji Zdrowia, uwzględniającymi kraj i miejsce pobytu, lekowrażliwość zarodźców zimnicy na preparaty przeciwmalaryczne, a także wiek, stan ogólny pacjenta oraz historię dotychczasowej profilaktyki farmakologicznej i leczenia w kierunku malarii.

W trakcie hospitalizacji pacjentów w Klinice, rozmazy krwi obwodowej w kierunku pasożytów malarii były wykonywane przy przyjęciu, a następnie powtarzane wielokrotnie w ciągu doby co 4-12 godzin celem oceny gatunku (lub gatunków) zarodźca zimnicy oraz monitorowania wysokości parazytemii podczas prowadzenia swoistej terapii przeciw pasożytniczej i objawowej. Częstotliwość wykonywania preparatów grubej kropli i cienkiego rozmazu krwi obwodowej uzależniano od stanu klinicznego pacjenta: im cięższy był stan ogólny i większe natężenie inwazji tym więcej wykonywano bezpośrednich badań parazytologicznych. Analiza mikroskopowa preparatów krwi obwodowej była kontynuowana aż do uzyskania ujemnych rozmazów wykonanych w ciągu trzech kolejnych dni. Ustąpienie objawów klinicznych, normalizacja parametrów morfologiczno-biochemicznych krwi obwodowej oraz trzykrotnie ujemne rozmazy w kierunku zarodźców zimnicy były dowodem sukcesu terapeutycznego i skutecznego wyleczenia pacjenta.

Ocena antygenów zarodźca zimnicy we krwi obwodowej była wykonywana dwukrotnie - w dniu przyjęcia pacjenta do Kliniki, przed rozpoczęciem swoistego leczenia przeciwmalarycznego oraz w dniu wypisu chorego ze szpitala. Poziom antygenów *Plasmodium* spp. we krwi obwodowej zawsze konfrontowano z wynikami bezpośrednich badań parazytologicznych preparatów mikroskopowych w kierunku pasożytów malarii. Analiza poziomu przeciwciał w kierunku *Plasmodium* spp. w surowicy krwi była przeprowadzana w pierwszym dniu pobytu chorego w Klinice, a w przypadku niestwierdzenia obecności swoistych przeciwciał we krwi obwodowej badanie powtarzano po upływie kolejnych 7 i 14 dni.

U wszystkich pacjentów z zimnicą, parazytologiczne badania mikroskopowe i immunodiagnostyczne, objęte tematem rozprawy doktorskiej, wykonywano zawsze przed włączeniem swoistego leczenia przeciw pasożytniczego

## 3.2. Pacjenci objęci badaniami epidemiologiczno-klinicznymi i laboratoryjnymi

### 3.2.1. Pacjenci zarażeni zarodźcem malarii

Badania epidemiologiczno-kliniczne oraz laboratoryjne przeprowadzono u 47 pacjentów w wieku 22-59 lat (średnia wieku  $39,0 \pm 10,8$  lat) z potwierdzonym ostrym epizodem (lub licznymi epizodami) malarii, którzy zostali przyjęci w trybie nagłym do Kliniki Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (n=44) w okresie od stycznia 2001 roku do października 2012 roku lub też byli hospitalizowani w odległych ośrodkach medycznych w kraju z powodu zagrażających życiu objawów klinicznych po pobycie w rejonach endemicznego występowania zimnicy, u których ostateczne potwierdzenie rozpoznania przeprowadzono w Klinice (n=3). Grupa badana składała się z 6 kobiet w wieku 23-59 lat (średnia wieku  $39,4 \pm 14,9$  lat) oraz 41 mężczyzn w wieku 22-58 lat (średnia wieku  $38,9 \pm 10,1$  lat). W grupie badanej było 42 Polaków w wieku 22-59 lat (średnia wieku  $39,3 \pm 11,1$  lat), a także 5 imigrantów z Afryki w wieku 32-40 lat (średnia wieku  $36,8 \pm 4,1$  lat): po jednej osobie z Kenii, Ghany i Sierra Leone oraz dwóch obywateli Nigerii. Osoby pochodzące z kontynentu afrykańskiego, które czasowo lub na stałe mieszkały w Polsce, ulegały zarażeniu *Plasmodium* spp. przeważnie podczas podróży do ojczystego kraju, w celu odwiedzin swoich krewnych i przyjaciół (n=4). Imigrant z Sierra Leone przebywał w Polsce od 13 lat, pacjenci pochodzący z Nigerii pracowali w Polsce odpowiednio 10 i 12 lat, a pacjent pochodzący z Ghany studiował w Poznaniu od 3 lat. 56-letni pacjent, który importował zimnicę z Kenii, przebywał w Polsce od 2 tygodni w celach służbowych. Cztery osoby były hospitalizowane i leczone w Klinice wielokrotnie, z powodu nawracających epizodów zimnicy.

Powodem przyjęcia chorych do szpitala była wysoka gorączka poprzedzona dreszczami i często objawy niewydolności wielonarządowej po powrocie z krajów strefy międzyzwrotnikowej i subtropikalnej. U każdej z osób wykonywano parazytologiczne badania mikroskopowe krwi obwodowej, na podstawie których potwierdzono zachorowanie na zimnicę wywołaną zarodźcem *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* lub inwazje mieszane wywoływane przez więcej niż jeden gatunek *Plasmodium* sp. **U czterech pacjentów, leczonych już uprzednio w Klinice z powodu malarii, stwierdzono kolejną reaktywację zarażenia *P. vivax*: u**

trzech osób dwukrotną, a w jednym przypadku – jednokrotną, stąd też łącznie w okresie objętym badaniami klinicznymi w Ośrodku Poznańskim hospitalizowano lub konsultowano 54 przypadki malarii, w tym 51 leczonych w Klinice i 3 przypadki pochodzące z oddziałów chorób zakaźnych południowej Polski.

### **3.2.2. Pacjenci grupy kontrolnej**

Do grupy kontrolnej zakwalifikowano 50 wybranych pacjentów - misjonarzy, wolontariuszy akcji humanitarnych i pracowników ośrodków misyjnych w wieku od 26 do 69 lat (średnia wieku  $46,5 \pm 11,1$  lat), którzy byli hospitalizowani w Klinice Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu w okresie od stycznia 2001 roku do października 2012 roku. W grupie kontrolnej znalazło się 48 Polaków, w tym 12 kobiet w wieku 29-58 lat (średnia wieku  $46,4 \pm 10,6$  lat) i 36 mężczyzn w wieku 26-69 lat (średnia wieku  $46,5 \pm 11,5$  lat) oraz dwóch mieszkańców Afryki - 40-letnia imigrantka z Burundi pracująca jako siostra zakonna w Kamerunie oraz 56-letni misjonarz z Tanzanii.

Powodem przyjęcia tych osób do Kliniki było wykonanie badań kontrolnych po długotrwałym pobycie w krajach strefy międzyzwrotnikowej i subtropikalnej, endemicznych dla występowania pasożytniczych i infekcyjnych chorób egzotycznych oraz wydanie orzeczenia lekarskiego dotyczącego zdolności do dalszej pracy w krajach odmiennej strefy klimatyczno-sanitarnej. Głównym celem wyjazdu do krajów pozaeuropejskich dla osób z grupy kontrolnej była praca w ośrodkach misyjnych i placówkach humanitarnych, która trwała od 2 miesięcy do 38 lat, średnio 14,6 lat. Pacjenci zakwalifikowani do tej grupy nie zgłaszali dolegliwości zdrowotnych związanych z malarią, a w badaniu przedmiotowym nie stwierdzano u nich objawów klinicznych charakterystycznych dla tej jednostki chorobowej. U każdego z powyższych pacjentów wykluczono malarię na podstawie ujemnych wyników badania preparatów grubej kropli i cienkiego rozmazu krwi obwodowej, które były wykonywane trzykrotnie podczas hospitalizacji w Klinice.

### **3.3. Badania epidemiologiczne**

Wywiad epidemiologiczny dotyczący podróżowania do krajów odmiennej strefy klimatyczno-środowiskowej i sanitarno-higienicznej, obejmował szczegółowe

informacje na temat rodzaju i charakteru podróży tropikalnej, długości wyjazdu, czasu i miejsca pobytu oraz zawierały dokładną analizę czynników ryzyka zarażenia zarodźcem zimnicy, które zawarto w standardowym kwestionariuszu pytań opracowanym w Klinice i każdorazowo dołączanym do historii choroby pacjenta. Pytania epidemiologiczne uwzględniały dokładną lokalizację (kontynent, kraj, region, położenie) i warunki geograficzne miejsca pobytu w tropiku (środowisko, klimat, pora roku, ukształtowanie terenu), precyzowały charakter (np. indywidualny lub zorganizowany), cel (np. służbowy, prywatny) i rodzaj wyjazdu (wypoczynkowo-rekreacyjny, sportowy, dyplomatyczny, edukacyjny, naukowo-badawczy) oraz zawierały informacje na temat podróży do krajów strefy tropikalnej odbytych w przeszłości. Dla osób wyjeżdżających do krajów strefy gorącej w celach zawodowych, istotne znaczenie posiadało precyzyjne określenie rodzaju wykonywanej pracy (np. służba wojskowa, ochrona zdrowia, działalność edukacyjna, praca misyjna lub humanitarna, przewozy lotnicze lub morskie, organizacja imprez turystycznych, prowadzenie pomiarów geodezyjnych w terenie, poszukiwanie złóż ropy naftowej, praca naukowo-badawcza, uprawianie sportu). Kolejna grupa pytań dotyczyła warunków sanitarno-higienicznych oraz ogólnych warunków życia (hotel o wysokim standardzie, hotel bez klimatyzacji, pensjonat, pokój gościnny, pole namiotowe, obozowisko w dżungli, bungalow) i uwzględniała także ryzyko narażenia na ukłucia owadów w porze nocnej. Pytania dokładnie określały także rodzaj stosowanej profilaktyki przeciwmalarycznej. W przypadku stosowania profilaktyki farmakologicznej pacjent był proszony o podanie nazwy i dawki stosowanego leku w kierunku malarii, regularności przyjmowania preparatu oraz okresu czasu w jakim pobierał lek przeciwmalaryczny. Jeżeli chory używał środków profilaktyki mechanicznej, to odpowiadał na pytania precyzujące rodzaj stosowanych barier mechanicznych, które chroniły przed ukłuciami komarów (moskitiera, siatki w drzwiach i oknach, repelenty, odpowiedni ubiór po zachodzie słońca). Pytania zawarte w kwestionariuszu uwzględniały też inne czynniki, które mogły wpłynąć na wzrost ryzyka zachorowania na malarię, takie jak wykonywanie tatuaży skóry, kolczykowanie, pobyty w ośrodkach zdrowia i szpitalach tropikalnych oraz zabiegi inwazyjne, które wykonywano podczas hospitalizacji i w trybie ambulatoryjnym. W wywiadzie uwzględniano również istnienie chorób przewlekłych i długotrwałe stosowanie leków, które mogły modyfikować i wpływać na obraz kliniczny malarii. Jednym z bardziej istotnych elementów wywiadu epidemiologicznego, była historia

poprzednich epizodów zimnicy przebytych w przeszłości i przyjmowanych dotąd leków przeciimalarycznych w celach terapeutycznych.

### **3.4. Badania kliniczne pacjentów**

U pacjentów gorączkujących po powrocie z krajów strefy międzyzwrotnikowej i subtropikalnej, kierowanych do Kliniki z podejrzeniem malarii, zwracano uwagę na czas trwania i wysokość gorączki oraz charakter toru gorączkowego (nieregularny, ciągły, hektyczny, nawrotowy). W badaniu podmiotowym uwzględniano dolegliwości typowe dla przebiegu klinicznego malarii, takie jak dreszcze, uczucie ziębnienia dystalnych części kończyn, zlewne poty, bóle głowy, znaczne osłabienie ogólne, bóle mięśni, ogólne rozbiecie, zaburzenia świadomości, a także mniej charakterystyczne objawy chorobowe spotykane w zimnicy, do których należą bóle brzucha, nudności, wymioty, biegunka, duszność, zaburzenia oddawania moczu i nieprawidłowe krwawienie z błon śluzowych. Jednym z najważniejszych elementów wywiadu lekarskiego, decydujących o rokowaniu klinicznym pacjenta, było ustalenie okresu czasu jaki minął od pojawienia się pierwszych objawów chorobowych do momentu zgłoszenia się do Kliniki.

Badanie przedmiotowe obejmowało ocenę stanu ogólnego pacjenta, pomiar temperatury ciała, ciśnienia krwi oraz częstości akcji serca, które mogłyby wskazywać na zagrażający wstrząs septyczny. Ocenie poddawano kolor skóry, twardówek i błon śluzowych jamy ustnej, celem potwierdzenia niedokrwistości, niedotlenienia, zaburzeń przemiany bilirubiny i żółtaczkę oraz występowania ciężkich zaburzeń w zakresie układu krzepnięcia i fibrynolizy, przejawiających się pod postacią wybroczyn lub krwawień z błon śluzowych i narządów wewnętrznych. Monitorowano liczbę oddechów na minutę i mechanikę oddychania oraz oceniano charakter szmeru oddechowego, aby wykluczyć prawdopodobieństwo wystąpienia zapalenia płuc, ostrej niewydolności oddechowej i obrzęku płuc. Badaniem palpacyjnym oceniano wielkość wątroby i śledziony w kierunku obecności hepatosplenomegalii, a przede wszystkim zespołu hyper-reaktywnej splenomegalii tropikalnej pojawiającego się w wyniku wielokrotnych inwazji na terenach endemicznych, a zwłaszcza reaktywacji zarażeń wywoływanych przez *P. vivax* (Allam i wsp., 2008). Analizowano parametry czynności nerek, które mogłyby wskazywać na ostrą niewydolność tego narządu w oparciu o obserwację godzinnej objętości wydalanego moczu, w celu wykluczenia

oligurii lub anurii, a także oceniano kolor moczu pod kątem obecności niekorzystnie rokującego czarnomoczu zimniczego (ang. „*blackwater fever*”). Obecność malarii mózgowej rozpoznawano na podstawie oceny aktywności układu nerwowego z użyciem popularnej skali śpiączki wg Glasgow GCS (ang. *Glasgow Coma Scale*) (Tabela I).

**Tabela I.**

**Ocena stanu świadomości i przytomności pacjentów z malarią, hospitalizowanych i konsultowanych w Klinice Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych w Poznaniu, wg skali Glasgow.**

<b>Czynniki oceniane</b>	<b>Kryteria punktacji</b>
<b>Otwieranie oczu</b>	4 – spontanicznie 3 - na polecenie 2 - na bodźce bólowe 1 - pacjent nie otwiera oczu
<b>Kontakt słowny</b>	5 - odpowiedź logiczna, pacjent zorientowany co do miejsca i czasu 4 - odpowiedź splątana, pacjent zdezorientowany 3 - odpowiedź nieadekwatna, nie na temat, niewłaściwe słowa, krzyk 2 - niezrozumiałe dźwięki, pojękiwanie 1 - brak reakcji
<b>Reakcja ruchowa</b>	6 - spełnianie ruchowych poleceń słownych lub migowych 5 - ruchy celowe, pacjent lokalizuje źródło bólu 4 - reakcja obronna na ból: wycofanie lub próba usunięcia bodźca bólowego 3 - patologiczna reakcja zgięciowa, objawy odkorowania 2 - patologiczna reakcja wyprostna, objawy odmóżdzeniowe 1 - brak reakcji

Charakter przebiegu klinicznego importowanej do Polski zimnicy był oceniany w oparciu o aktualnie obowiązujące i ujednoczone kryteria Światowej Organizacji Zdrowia, z uwzględnieniem zarówno klinicznych, jak i laboratoryjnych wykładników ciężkich, powikłanych zarażeń *Plasmodium* spp. bezpośrednio zagrażających życiu i zdrowiu (Tabela II) oraz markerów o poważnym rokowaniu klinicznym spotykanych w postaciach agonalnych malarii (Tabela III). Podczas badania klinicznego, duży nacisk kładziono na wykluczenie takich odchyłeń od stanu prawidłowego, jak np. temperatura ciała wyższa niż 40°C lub zwiększone napięcie mięśni poprzecznie prążkowanych, które należą do grupy niekorzystnych markerów prognostycznych. Czarnomocz zimniczy, połączony nieodłącznie z bardzo wysoką parazytemią we krwi



obwodowej i wynikający z masywnego rozpadu zarażonych erytrocytów, związany jest z ostrą martwicą cewek nerkowych i niewydolnością nerek. Inne, niekorzystne wykładniki powiklanej malarii to np. obrzęk tarczy nerwu II, który wykluczano na podstawie badania okulistycznego przeprowadzonego przez specjalistę w każdym przypadku ciężkiej zimnicy oraz brak odruchu rogówkowego, który rozpoznaje specjalista anesteziolog w przypadku utraty przytomności przez pacjenta.

**Tabela II.**

**Kryteria kliniczne i laboratoryjne ciężkiej malarii, stosowane u pacjentów hospitalizowanych i konsultowanych w Klinice Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych (wg Światowej Organizacji Zdrowia, 2000).**

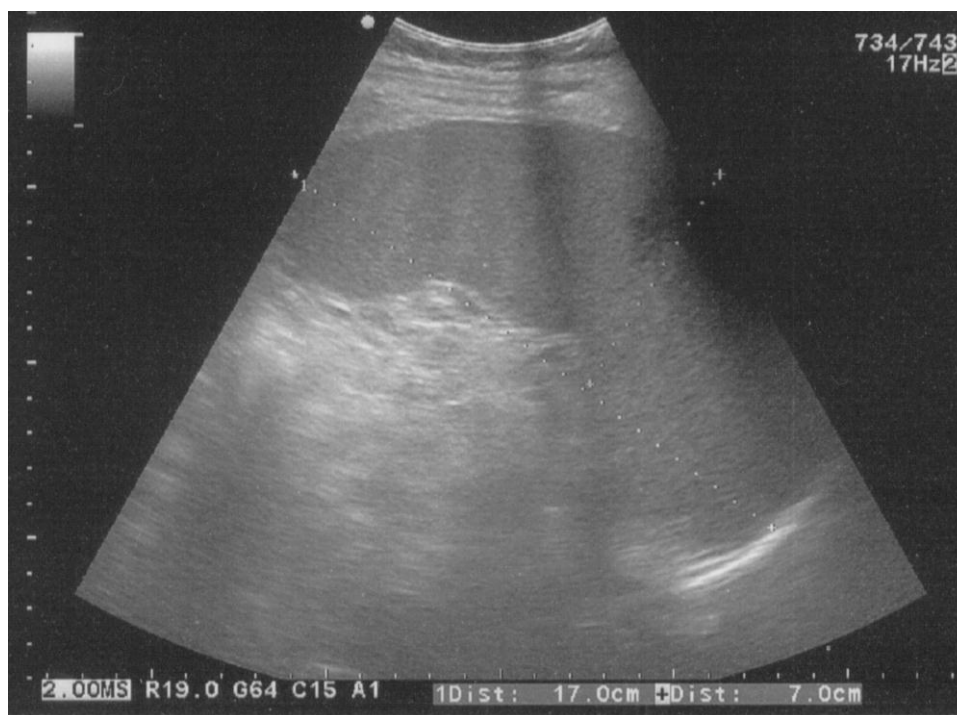
<b>Kliniczne</b>	<b>Laboratoryjne</b>
skrajne wyczerpanie	głęboka niedokrwistość, Hgb < 5 g/dl, HTK < 15%
zaburzenia świadomości	
ostra niewydolność oddechowa	hipoglikemia < 2,2 mmol/l lub < 40 mg/dl
obrzęk płuc (potwierdzony radiologicznie)	kwasica metaboliczna, wodorowęglany < 15 mmol/l
liczne drgawki	
zapaść naczyniowa, wstrząs septyczny	wysokie stężenie mleczanów > 5 mmol/l
cechy skazy krwotocznej	hiperparazytemia > 2%
żółtaczka	niewydolność nerek, kreatynina > 265 μmol/l lub > 3,0 mg/dl
hemoglobinuria (czarnomocz zimniczy)	

**Tabela III.**

**Wykładniki kliniczne i laboratoryjne o niekorzystnym znaczeniu prognostycznym w powikłanych przypadkach zimnicy wywoływanej przez *P. falciparum* (wg Światowej Organizacji Zdrowia, 2000).**

<b>Kliniczne</b>	<b>Laboratoryjne</b>
wiek poniżej 3 lat	hiperparazytemia >250 tys./μl lub > 2% w rozmazie krwi obwodowej
głęboka śpiączka	obecność schizontów <i>P. falciparum</i>
drgawki	granulocyty z hemozoiną
osłabienie siły mięśniowej	leukocytoza > 12 tys./μl
brak odruchów rogówkowych	niskie stężenie hemoglobiny < 5 g/dl
zespół zaburzeń oddychania	hipoglikemia < 40 mg/dl
objawy niewydolności wielonarządowej	wysokie stężenie mocznika > 60 mg/dl, wysokie stężenie kreatyniny > 3,0 mg/dl
zapaść naczyniowa (tzw. „algid malaria”)	wysokie stężenie kwasu mlekowego w surowicy > 5 mmol/l
wzmożone napięcie mięśniowe lub <i>opisthotonus</i>	niskie stężenie antytrombiny III
obrzęk siatkówki	hipertransaminazemia > 3x
obrzęk tarczy nerwu wzrokowego	wysokie stężenie TNF i kwasu mlekowego oraz niskie stężenie glukozy w płynie mózgowo-rdzeniowym

U każdego z pacjentów wykonywano także podstawowe badania obrazowe w postaci radiogramu klatki piersiowej i oceny ultrasonograficznej jamy brzusznej, a także badanie elektrokardiograficzne, aby ostatecznie wykluczyć zapalenie i obrzęk płuc, ostre powikłania malarii w postaci splenomegalii (Ryc. 11), czy pęknięcia śledziony oraz zapalenie wsierdzia i mięśnia sercowego. Powyższe badania były pomocne w różnicowaniu innych przyczyn stanów gorączkowych, objawów rzekomogrypowych i chorób współistniejących u pacjentów z malarią.



**Ryc. 11. Masywna splenomegalia w badaniu ultrasonograficznym jamy brzusznej u 24-letniego pacjenta z malarią *P. falciparum* importowaną z Nigerii. Aparat Aloka Alpha-7 (Japonia). Kolekcja własna Kliniki.**

W przypadku trzech pacjentów z malarią rozpoznanych w Klinice, a leczonych na oddziałach chorób zakaźnych w innych ośrodkach akademickich południowej Polski, była dostępna pełna dokumentacja medyczna tych chorych, zawierająca wywiad epidemiologiczny oraz wyniki badań klinicznych i laboratoryjnych.

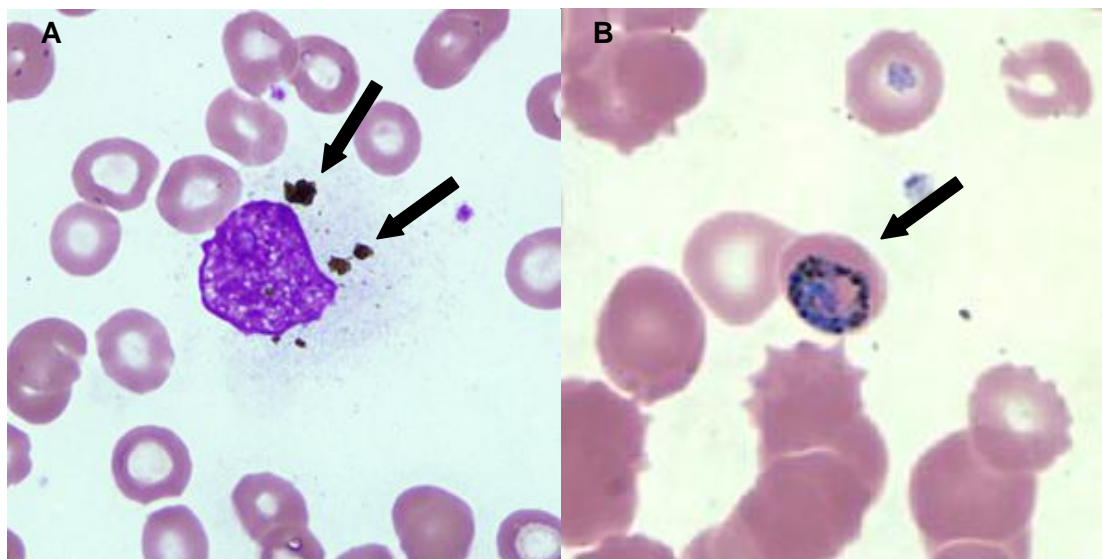
## 3.5. Badania laboratoryjne

### 3.5.1. *Badania morfologiczno-biochemiczne krwi obwodowej*

W ocenie stanu ogólnego pacjenta, niezwykle pomocna była analiza wyników badań laboratoryjnych, które wykonywano niezwłocznie po przyjęciu pacjenta do Kliniki, aby ocenić ciężkość przebiegu klinicznego zimy, a następnie wielokrotnie powtarzano podczas kolejnych dni hospitalizacji, aby monitorować stan ogólny pacjenta i postępy w leczeniu. Monitorowano szczegółowo parametry morfologii krwi obwodowej, w tym stężenie hemoglobiny i wielkość hematokrytu, będące odzwierciedleniem poziomu niedokrwistości oraz liczbę płytek krwi w  $\text{mm}^3$  określającą ryzyko krwawienia. Leukopenia z neutropenią i monocytózą była często obserwowana u pacjentów z malarią, natomiast leukocytoza należała do niekorzystnych wykładników ciężkiej malarii przebiegającej z ryzykiem współistniejących nadkażeń bakteryjnych i uogólnionej posocznicy. Wysokie stężenia markerów zapalnych były nieodłącznie związane z zarażeniem *Plasmodium* spp., a wielokrotne monitorowanie stężenia prokalcytoniny i białka C-reaktywnego znacznie ułatwiało bliższą ocenę stanu klinicznego pacjentów oraz skuteczności prowadzonej terapii przeciwpasożytniczej i objawowej. Stopień zaburzeń w układzie krzepnięcia i fibrynolizy oraz ryzyko rozwoju zespołu wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (DIC, ang. *Disseminated Intravascular Coagulopathy*) analizowano także na podstawie wartości współczynników krzepliwości krwi – międzynarodowego współczynnika znormalizowanego czasu protrombinowego INR, czasu kaolinowo-kefalinowego APTT (czas częściowej tromboplastyny po aktywacji) oraz stężenia fibrynogenu, produktów jego rozpadu (D-dimerów) i antytrombiny III. U chorych wykonywano także regularnie badanie poziomu glukozy, wykładników czynności wątroby oraz nerek. Obecność kwasicy metabolicznej lub oddechowej wykluczano na podstawie analizy wyników gazometrii krwi włośniczkowej i poziomu mleczanów w surowicy krwi (Tabela II). Dodatkowo wykonywane badanie ogólne moczu pomagało monitorować poziom wydalanego białka, zawartość barwników żółciowych i wykluczało nerkowe przyczyny stanów gorączkowych, jak np. odmiedniczkowe lub kłębuszkowe zapalenie nerek.

Do grupy chorych wyjątkowo predysponowanych do wystąpienia wielonarządowych powikłań w przebiegu ciężkiego przebiegu zimy należeli pacjenci z wysoką parazytemią we krwi obwodowej, stężeniem aminotransferaz

(aminotransferazy alaninowej i asparaginianowej) trzykrotnie przekraczającym normę, stężeniem mocznika > 60 mg/dl i kreatyniny > 3 mg/dl oraz obniżonym poziomem antytrombiny III (Tabela III). Markery parazytologiczne, świadczące o złym rokowaniu klinicznym u pacjentów z powikłaną zimnicą to przede wszystkim obecność schizontów *P. falciparum* w erytrocytach krwi obwodowej i hemozoiny w krwinkach białych (Ryc. 12 A i B).



Ryc. 12. Niekorzystne markery prognostyczne w ciężkiej malarii wywoływanej przez *P. falciparum*. A) Liczne złogi hemozoiny w cytoplazmie monocyta. B) Obecność pojedynczych schizontów *P. falciparum* w erytrocytach krwi obwodowej. Kolekcja własna Kliniki.

### **3.5.2. Badania parazytologiczne rozmazów krwi obwodowej w kierunku zarodźców malarii**

Ocena mikroskopowa preparatów grubej kropli i cienkiego rozmazu krwi obwodowej w kierunku malarii była przeprowadzana u każdego pacjenta z grupy badanej i kontrolnej. Badanie to jest aktualnie uznawane za metodę referencyjną dla ostatecznego potwierdzenia lub wykluczenia ostrego epizodu zimnicy oraz nadrzędną w odniesieniu do technik immunochromatograficznych i immunoenzymatycznych, wykrywających swoiste antygeny *Plasmodium* spp. u hospitalizowanych lub konsultowanych pacjentów. Analiza rozmazów krwi obwodowej w kierunku obecności form rozwojowych *Plasmodium* spp. była wykonywana w dniu przyjęcia pacjenta do Kliniki, celem potwierdzenia zachorowania i oceny natężenia inwazji oraz wielokrotnie

w trakcie hospitalizacji dla monitorowania skuteczności prowadzonego leczenia. Sukces terapeutyczny i wyleczenie pacjenta dokumentowały rozmazy krwi obwodowej, które nie wykazywały już obecności zarodźców zimnicy w ciągu 3 następujących po sobie dni.

Preparaty krwi obwodowej w kierunku malarii wykonywali i oceniali diagności laboratoryjni z Pracowni Diagnostyki Parazytologicznej, posiadający duże doświadczenie praktyczne w tej dziedzinie. Osoby te posiadały udokumentowane uprawnienia i certyfikaty referencyjnych ośrodków medycyny tropikalnej, poświadczające kwalifikacje w zakresie rozpoznawania laboratoryjnego zimnicy. W Katedrze stosowano technikę przygotowywania i barwienia preparatów krwi na obecność form rozwojowych *Plasmodium* spp., opracowaną w wiodącym ośrodku uniwersyteckim - *Clinical Diagnostic Parasitology Laboratory, Liverpool School of Tropical Medicine* w Wielkiej Brytanii.

Celem wykonania preparatu grubej kropli krwi obwodowej, pobierano kilka kropli krwi włośniczkowej z opuszki wybranego palca dłoni i наносzono je na środek odtłuszczonego szkiełka podstawowego. Opuszka palca, z którego pobierano materiał była uprzednio zdezynfekowana 70% roztworem alkoholu etylowego. Materiał rozcierano kolistym ruchem rogiem dodatkowego szkiełka mikroskopowego, które miało zaokrąglone brzegi, co zapobiegało uszkodzeniu krwinek i porysowaniu szkiełka, formując dość grube koło o średnicy około 1 cm. Do nakłucia opuszki palca stosowano jednorazowe, jałowe sztyleciki lub automatyczne nakłuwacze, które po pobraniu materiału do badań umieszczano w pojemniku przeznaczonym dla ostrych narzędzi, zawierających potencjalnie zakaźny materiał biologiczny. Po zapełnieniu, pojemniki były niszczone poprzez spalanie.

W celu wykonania cienkiego rozmazu krwi obwodowej, umieszczano 2-3 krople krwi pobranej bezpośrednio z opuszki palca ręki pacjenta na brzegu czystego i odtłuszczonego szkiełka podstawowego i oszlifowanym brzegiem drugiego szkiełka mikroskopowego, ustawionego pod kątem 45° rozprowadzano jednolicie materiał wzdłuż szkiełka.

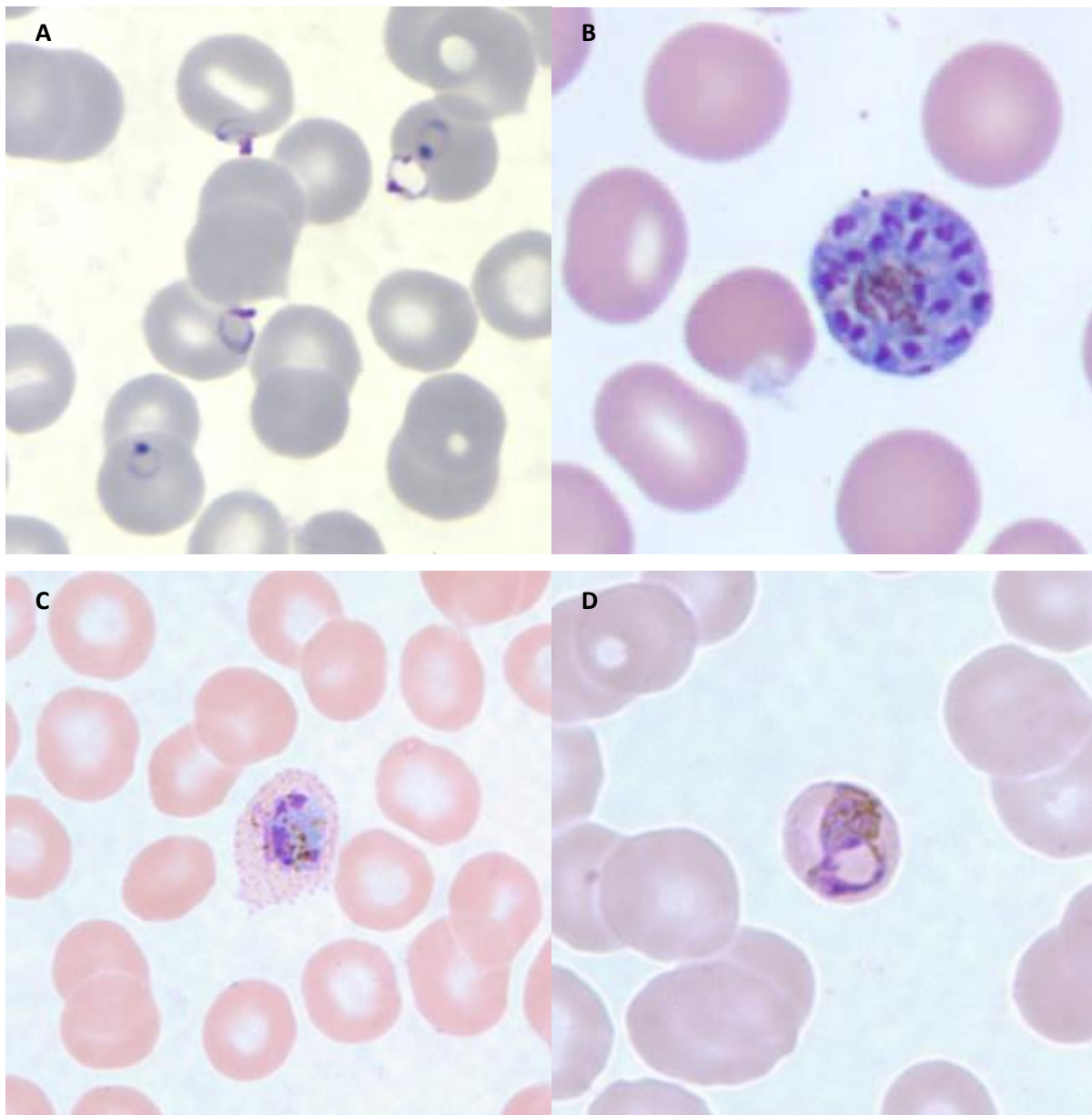
Kolejnym etapem przygotowania preparatów grubej kropli i cienkiego rozmazu krwi obwodowej było ich suszenie w temperaturze pokojowej i barwienie, które rozpoczynano co najmniej 30 minut później. Cienki rozmaz przed rozpoczęciem procesu barwienia poddawano działaniu metanolu absolutnego przez co najmniej 30 sekund, celem utrwalenia krwinek czerwonych. Preparatów grubej kropli krwi

obwodowej nie utrwalano w alkoholu metylowym, aby wywołać hemolizę krwinek czerwonych podczas procesu barwienia. Do zabarwienia preparatów mikroskopowych używano świeżo przygotowanego roztworu Giemsy rozpuszczonego w buforze fosforanowym o pH 7,2, w stężeniu 5% dla cienkiego rozmazu oraz 10% stężeniu dla grubej kropli. Po 30 minutach barwienia, szkiełka mikroskopowe płukano w wodzie destylowanej. Po kolejnym suszeniu, które trwało 30 minut, preparaty były oceniane z użyciem mikroskopu świetlnego z obiektywem immersyjnym pod powiększeniem 1000-krotnym (100-krotne powiększenie obiektywu i 10-krotne powiększenie okularu).

Obowiązującym standardem było oglądanie preparatu grubej kropli krwi obwodowej przez co najmniej 5 minut, co odpowiadało 200 polom widzenia ocenianym w obiektywie immersyjnym, tak aby móc wykryć nawet niewielką intensywność zarażenia. Czułość analityczna tej metody dla doświadczonego diagnosty laboratoryjnego wynosi 10-20 zarodźców zimnicy w 1  $\mu$ l krwi i jest porównywalna do technik biologii molekularnej, co odgrywa kluczową rolę w podejmowaniu decyzji o potwierdzeniu lub wykluczeniu malarii (Warrell i Gilles, 2002; Wongsrichanalai i wsp., 2007). Cienki rozmaz krwi obwodowej definiował gatunek lub gatunki *Plasmodium* spp. oraz służył do określania stopnia intensywności inwazji. Przynależność gatunkową obserwowanych w mikroskopie świetlnym zarodźców zimnicy ustalano na podstawie charakterystycznych cech morfologicznych poszczególnych form rozwojowych pierwotniaków oraz zarażonych erytrocytów (Ryc. 13 A-D).

Wielkość parazytemii we krwi obwodowej oznaczano jako odsetek procentowy zarażonych krwinek czerwonych (%), w których stwierdzano obecność form rozwojowych *Plasmodium* spp. wśród analizowanych 10.000 erytrocytów. Na obliczenie dokładnej liczby zarodźców zimnicy w mikrolitrze krwi (p) pozwala również wzór matematyczny zalecany przez Światową Organizację Zdrowia:  $p = (n/WBC) \times 8000$  gdzie „n” oznacza łączną liczbę stwierdzanych pasożytów a „WBC” liczbę krwinek białych w ocenianych polach widzenia. Uzyskaną wartość mnoży się przez osiem tysięcy, zakładając, że jeden mikrolitr krwi dorosłego człowieka zawiera średnio 8.000 leukocytów. Ten sposób oznaczania parazytemii we krwi obwodowej został wykorzystany w zestawieniu niekorzystnych prognostycznie wykładników laboratoryjnych powikłanej malarii *P. falciparum* (patrz podrozdział 3.4., Tabela III). Preparaty cienkich rozmazów krwi obwodowej wymagały co najmniej 20-minutowej

obserwacji w mikroskopie świetlnym z użyciem obiektywu immersyjnego, co odpowiadało analizie około 20.000 erytrocytów i zapewniało czułość analityczną metody na poziomie 100 pierwotniaków w 1  $\mu$ l (Warrell i Gilles, 2002).



Ryc. 13. Cechy morfologiczne poszczególnych gatunków *Plasmodium* sp. w zarażonych erytrocytach w cienkim rozmazie krwi obwodowej. A) Młode trofozoity *P. falciparum*. B) Dojrzały schizont *P. vivax*. C) Późny trofozoit *P. ovale*. D) Trofozoit *P. malariae*. Kolekcja własna Kliniki.

Każdorazowo grubą kroplę i cienki rozmaz wykonywano kilkakrotnie, aby do analizy wybrać preparaty o najlepszej jakości oraz na wypadek uszkodzenia jednego

z nich. Na każdym szkiełku mikroskopowym naniesione były dane identyfikacyjne pacjenta oraz godzina i data wykonania badania.

### **3.5.3. Wykrywanie swoistych przeciwciał w kierunku *Plasmodium spp.* we krwi obwodowej techniką immunofluorescencji pośredniej**

Oznaczanie swoistych przeciwciał antymalarycznych w surowicy krwi obwodowej u badanych pacjentów było uzupełniającą techniką immunodiagnostyczną dla oceny stopnia immunizacji w kierunku *Plasmodium spp.* U osób, które podróżowały do tropiku po raz pierwszy, wykrycie swoistych przeciwciał było jednoznaczne z potwierdzeniem ostrego ataku malarii. U pacjentów wyjeżdżających do krajów endemicznego występowania malarii wielokrotnie, stwierdzenie serokonwersji swoistych przeciwciał po przyjeździe do Polski decydowało o rozpoznaniu zimnicy nabytej podczas ostatniego pobytu w strefie tropikalnej. U misjonarzy, wolontariuszy akcji humanitarnych, pracowników ośrodków misyjnych oraz imigrantów z krajów odmiennej strefy klimatyczno-sanitarnej, dodatni poziom swoistych przeciwciał świadczył o malarii przebytej w przeszłości i nabyciu tzw. częściowej odporności przeciwmalarycznej (ang. *antimalarial semi-immunity*).

Wykrywanie całkowitej puli swoistych przeciwciał IgM i IgG w kierunku powierzchniowych antygenów pierwotniaków malarii wykonywano za pomocą komercyjnie dostępnego zestawu diagnostycznego (Falciparum-Spot IF), wykorzystującego technikę immunofluorescencji pośredniej (*bioMérieux*, Marcy l'Etoile, Francja). Test zawierał szkiełka mikroskopowe ze studzienkami o średnicy 7 mm, opłaszczonymi antygenem *P. falciparum* w postaci trofozoitów zarodźca, pochodzących z hodowli komórkowej *in vitro* na erytrocytach ludzkich grupy A.

Uprzednio przygotowane, kolejno wzrastające rozcieńczenia surowic badanych pacjentów w buforze fosforanowym PBS o pH 7,2 nakładano w ilości po 10  $\mu$ l do każdego dołka płytki i inkubowano przez 25 minut w temperaturze 37°C w wilgotnej komorze. W każdej serii testu stosowano kontrolną surowicę pozytywną i negatywną, dostarczaną przez producenta. Po etapie inkubacji, szkiełka płukano 2-krotnie przez 10 minut w buforze fosforanowym PBS, a następnie dodawano przeciwciało wtórne przeciwko immunoglobulinom ludzkim IgM i IgG znakowane fluoresceiną, rozcieńczone w stosunku 1/200 w buforze fosforanowym z dodatkiem błękitu Evansa (0,1 g/l). Po kolejnych 25 minutach inkubacji w wilgotnej komorze w temperaturze



37°C szkiełka płukano 2-krotnie w buforze fosforanowym o pH 7,2 i osuszano. Po umocowaniu szkiełka nakrywkowego, preparaty oceniano w mikroskopie fluorescencyjnym w ciągu 30 min. od zakończenia reakcji, używając 40-krotnego powiększenia obiektywu (Axioskop, Zeiss, Niemcy).

Wyniki testu były podawane jako rozcieńczenia surowicy, w których stwierdzano obecność swoistych przeciwciał łączących się z antygenem *P. falciparum*, opłaszczonym w poszczególnych dołkach szkiełka mikroskopowego. Badane próbki surowic były oceniane jako dodatnie, jeżeli wykazywały fluorescencję w rozcieńczeniu wyższym lub równym 1/80, natomiast wyniki określano jako wątpliwe przy fluorescencji w zakresie rozcieńczeń od 1/20 do 1/40. Surowice nie wykazujące zjawiska fluorescencji lub z fluorescencją w rozcieńczeniach <1/20 interpretowano jako nie posiadające swoistych przeciwciał w kierunku *Plasmodium* spp.

Ze względu na podobieństwo antygenowe różnych gatunków zarodźca zimnicy, test immunofluorescencyjny wykrywał obecność przeciwciał nie tylko w kierunku *P. falciparum*, ale też pozostałych gatunków *Plasmodium*. Czułość i swoistość diagnostyczna tej metody dla pacjentów z potwierdzoną malarią została określona na odpowiednio 70,5% i 99,6% (Doderer i wsp., 2007).

### **3.5.4. Wykrywanie swoistych antygenów *Plasmodium* spp. we krwi obwodowej**

#### **3.5.4.1. Wykrywanie antygeny HRP-2 oraz dehydrogenazy mleczanowej we krwi obwodowej za pomocą testów immunochromatograficznych**

Zastosowany w badaniach test immunochromatograficzny DRG® Malaria pf/pv Antigen Test (*DRG International Inc.*, New Jersey, USA) był metodą jakościową i wykrywał obecność dwóch różnych antygenów zarodźca zimnicy: HRP-2, czyli białka bogatego w histydyne (ang. *Histidine-Rich Protein 2*) charakterystycznego wyłącznie dla *P. falciparum* oraz dehydrogenazy mleczanowej pLDH (ang. *Plasmodium Lactate Dehydrogenase*) swoistej dla *P. vivax* i pozostałych gatunków pasożyta, umożliwiając nie tylko rozpoznawanie malarii, ale również diagnostykę różnicową między poszczególnymi gatunkami *Plasmodium* spp. chorobotwórczymi dla człowieka. Niewątpliwą zaletą metody była możliwość przeprowadzenia badania w sytuacjach nagłych, np. w izbie przyjęć Szpitala lub bezpośrednio przy łóżku gorączkującego pacjenta oraz uzyskanie wyniku w ciągu kilkunastu minut. Stosunkowo mała

inwazyjność metody, polegająca na badaniu krwi włośniczkowej pobranej bezpośrednio z opuszki palca pacjenta czyniła ten test bardzo praktycznym.

Test miał formę trwałej, plastikowej kasety, zawierającej wewnątrz pasek bibuły nitrocelulozowej, a w części zewnętrznej – podłużne okienko odczytu wyniku oraz dwie studzienki, służące do nakrapiania odpowiednio krwi pacjenta i buforu hemolizującego. Membrana nitrocelulozowa była fabrycznie opłaszczona swoistymi przeciwciałami monoklonalnymi w postaci oddzielnych linii, przebiegających w poprzek paska: przeciwciałem w kierunku antygeny HRP-2 oraz przeciwciałem przeciwko dehydrogenazie mleczanowej zarodźca zimnicy. Używany do testu bufor wywoływał hemolizę zarażonych erytrocytów i uwolnienie antygenów *Plasmodium* spp., wykrywanych podczas reakcji immunodiagnostycznej. W dolnej części bibuły chromatograficznej był umieszczony roztwór konjugatu w postaci mieszaniny przeciwciał monoklonalnych w kierunku HRP-2 i dehydrogenazy mleczanowej sprzężonych ze złotem koloidalnym. Do badania używano krwi włośniczkowej uzyskiwanej z opuszki palca pacjenta, po uprzednim zdezynfekowaniu miejsca pobrania materiału 70% roztworem alkoholu etylowego. Krew pobierano za pomocą dołączonej do zestawu mikrokapilary z antykoagulantem, który zapobiegał krzepnięciu krwi.

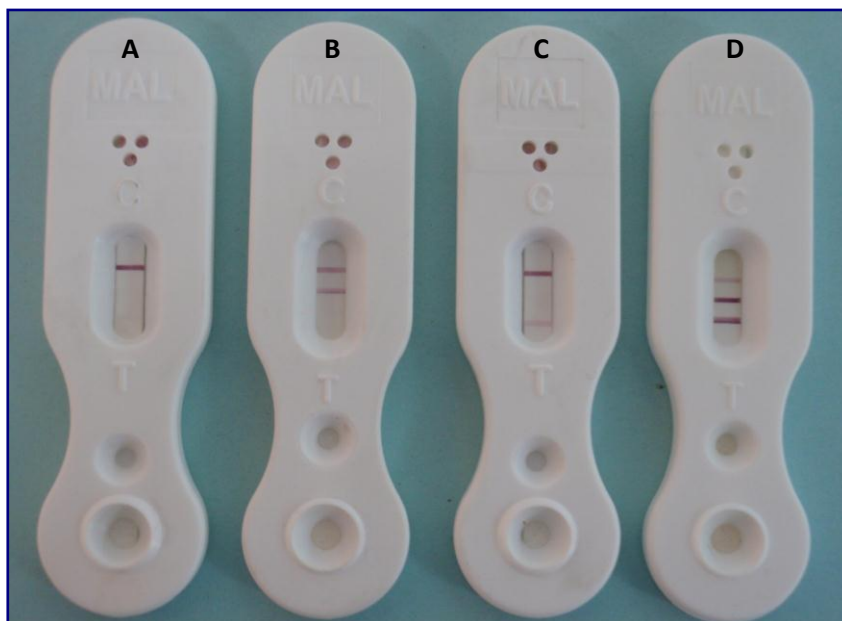
Próbkę krwi w ilości 5  $\mu$ l наносono do małej studzienki „S”, zlokalizowanej w środkowej części białej kasety, bezpośrednio na pasku nitrocelulozowym, natomiast do owalnego dołka umieszczonego u dołu kasety, w miejscu obecności konjugatu, dodawano 2 krople bufora hemolizującego (80  $\mu$ l). W przypadku obecności antygenów *Plasmodium* spp. w badanej próbce krwi pochodzącej od pacjenta, łączyły się one w kompleksy ze swoistymi przeciwciałami migrującymi z dolnej części bibuły, a te z kolei były wychwytywane przez przeciwciała monoklonalne opłaszczone na pasku nitrocelulozowym. Obecność dehydrogenazy i antygeny HRP-2 potwierdzały barwne linie uwidocznione w oknie odczytu, które były rezultatem reakcji przebiegających pomiędzy przeciwciałami monoklonalnymi opłaszczonymi na pasku nitrocelulozowym i powstającymi kompleksami antygen zarodźca - znakowane przeciwciałem, które tworzyły się podczas wędrówki buforu. Bufor migrujący na bibule chromatograficznej ku górze, usuwał również nadmiar zhemolizowanej krwi, ułatwiając wizualizację linii kontrolnej i linii testowych, które pojawiały się na pasku nitrocelulozowym w okienku testowym, w przypadku zarażenia zarodźcem zimnicy.

Na kasecie, tuż obok okienka testowego z paskiem bibuły chromatograficznej, znajdowały się symbole „C”, „1” i „2”, które oznaczały kolejno: kontrolę testu, *P. falciparum* i *P. vivax*. Wyznacznikiem prawidłowego wykonania testu i możliwości jego wykorzystania do dalszej analizy była obecność prążka kontrolnego „C”, który uwidaczniał się w górnej części kasety. Barwny, szaro-fioletowy prążek na wysokości symbolu „C” powstawał w wyniku reakcji pomiędzy przeciwciałem monoklonalnym w kierunku hemoglobiny zakotwiczonym na pasku nitrocelulozowym i hemoglobina obecna w badanej próbce krwi. Gdy na wysokości oznaczenia „1” pojawiała się szaro-fioletowa linia barwna oznaczało to wykrycie antygenu HRP-2 i rozpoznanie inwazji *Plasmodium falciparum*. Barwny prążek uwidoczniiony na wysokości oznaczenia „2” oznaczał, że w badanym materiale znajduje się dehydrogenaza mleczanowa (pLDH) swoista dla pozostałych gatunków *Plasmodium* spp. i wynik jest dodatni dla gatunków innych niż *P. falciparum*. Dehydrogenaza swoista dla *P. vivax*, *P. ovale* i *P. malariae* może być również wytwarzana przez niektóre szczepy *P. falciparum* (ang. *panmalarial antigen*). Czułość diagnostyczna zastosowanej metody badawczej na terenach nie-endemicznych osiągała wartość 98,6% dla wykrywania *P. falciparum*, natomiast dla *P. vivax* wynosiła 90,9%, przy swoistości diagnostycznej równej 100% (Houze i wsp., 2011).

Interpretacja wyników szybkich testów immunochromatograficznych była następująca: obecność wszystkich 3 barwnych prążków oznaczała inwazję *P. falciparum* lub inwazję mieszaną, obecność prążka kontrolnego „C” i pierwszego „1” wskazywała na inwazję wywołaną tylko przez *P. falciparum*, natomiast prążki „C” i „2” potwierdzały inwazję powodowaną innymi gatunkami zarodźców niż *P. falciparum* (*P. vivax*, *P. ovale* lub *P. malariae*). Test nie pozwalał na ostateczne rozpoznanie nazwy gatunkowej pierwotniaka innego niż *P. falciparum*, gdyż wykrywany antygen jest wspólny dla wszystkich tych gatunków (Ryc. 14). Szybkie testy diagnostyczne służące do wykrywania antygenów zarodźca zimnicy we krwi obwodowej mogą również być pomocne w rozpoznawaniu inwazji wywołanej przez nowy gatunek *P. knowlesi* (Hellemond i wsp., 2009). Jednakże o ostatecznym rozpoznaniu poszczególnych gatunków *Plasmodium* spp. u badanych pacjentów decydowało bezpośrednie badanie mikroskopowe preparatów krwi obwodowej.

Wyniki testów immunochromatograficznych analizowano po 20 minutach od zakończenia wykonywania procedury. Po odczytaniu rezultatów, testy traktowano jako materiał zakaźny i wraz z lancetami do nakłuwania skóry i kapilarami były one

wyrzucane do odpowiednich pojemników i niszczone. Wszystkie testy stosowane do badań miały aktualne daty ważności. Były one przechowywane zgodnie z zaleceniami producenta w temperaturze 4-30°C i chronione przed wpływem wilgoci poprzez wodoszczelne opakowanie i umieszczony w każdej saszetce z testem środek higroskopijny.



Ryc. 14. Zasady interpretacji wyników testu immunochromatograficznego w kierunku malarii. A) Wynik ujemny. B) Wynik dodatni dla *P. falciparum*. C) Wynik dodatni dla *P. vivax* i gatunków innych niż *P. falciparum*. D) Wynik dodatni wskazujący na obecność *P. falciparum* lub malarii mieszanej. Kolekcja własna Kliniki.

#### 3.5.4.2. Wykrywanie antygenu HRP-2 swoistego dla *Plasmodium falciparum* we krwi obwodowej za pomocą testu immunoenzymatycznego

Pomiar stężenia swoistego antygenu HRP-2 wytwarzanego wyłącznie przez *P. falciparum* był przeprowadzany za pomocą ilościowego testu immunoenzymatycznego Malaria Ag CELISA (Cellabs, Brookvale, Australia), opartego na odwróconej technice ELISA (ang. „double sandwich” Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Do badań objętych tematyką rozprawy doktorskiej wybrano oznaczenia antygenu *P. falciparum*, ze względu na najcięższy przebieg kliniczny inwazji wywoływanych przez ten gatunek zarodźca zimnicy oraz największe ryzyko występowania wielonarządowych powikłań i zgonu. Podjęto

**się próby wykorzystania pomiarów stężeń białka bogatego w histydynę we krwi obwodowej dla oceny klinicznej i prognostycznej pacjentów malarią, hospitalizowanych i konsultowanych w Klinice.**

Do analizy immunoenzymatycznej używano pełnej krwi żyłnej pacjenta pobieranej do probówki morfologicznej z wersenianem dwusodowym (EDTA). Próbkę krwi pochodzącą od tego samego pacjenta z różnych okresów hospitalizacji testowano zawsze jednocześnie w tej samej serii oznaczeń. Do momentu analizy, badany materiał biologiczny był przechowywany w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$ . Etap zamrożenia i odmrożenia wywoływał hemolizę badanej próbki krwi pacjenta, która była niezbędna do uwolnienia swoistego antygeny *P. falciparum* z erytrocytów, wykrywanego następnie w wyniku reakcji immunoenzymatycznej typu „*immunocapture*”.

Do poszczególnych dołków mikropłytki titracyjnej, opłaszczonych uprzednio przeciwciałem monoklonalnym przeciwko antygenowi HRP-2 (ang. *Histidine-Rich Protein*) dodawano kolejno próbki hemolizowanej krwi badanych pacjentów w ilości po 100  $\mu\text{l}$  do każdej studzienki, a następnie płytki inkubowano przez 60 minut w temperaturze pokojowej w wilgotnej komorze. Do każdej serii oznaczeń używano kontrolnego wzorca dodatniego i ujemnego, dołączonego do zestawu przez producenta, w ilości po 100  $\mu\text{l}$  do oddzielnych studzienek, w postaci podwójnego oznaczenia próby. Po pierwszym etapie inkubacji, płytki titracyjne płukano 4-krotnie w buforze fosforanowym (PBS) z dodatkiem detergentu Tween-20 (PBS/Tween) o pH 7,2. W następnym etapie reakcji dodawano przeciwciało wtórne w kierunku antygeny HRP-2 znakowane peroksydazą chrzanową (konjugat), rozcieńczone w buforze fosforanowym w stosunku 1/200, w ilości po 100  $\mu\text{l}$  do każdego dołka płytki. Po 60 min. inkubacji w temperaturze pokojowej w środowisku wilgotnym, płytki poddawano 4-krotnemu płukaniu w buforze PBS/Tween, w celu usunięcia nadmiaru konjugatu nie związanego z antygenem HRP-2 *P. falciparum*. Następnie dodawano chromogeny substrat reakcji w postaci roztworu 3,3',5,5'- tetrametylenobenzzydyny (TMB) rozcieńczonej w stosunku 1/20 w buforze zawierającym cytrynian sodowy i  $\text{H}_2\text{O}_2$ , w ilości 100  $\mu\text{l}$  do każdej studzienki i płytki inkubowano przez 15 min. w ciemności w temperaturze pokojowej. Formowanie barwnego produktu reakcji zatrzymywano poprzez dodanie 50  $\mu\text{l}$  roztworu 1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  do każdego dołka płytki, uzyskując niebieskie zabarwienie zawartości studzienek. Gęstość optyczna barwnego produktu reakcji (OD) była mierzona względem powietrza za pomocą automatycznego

spektrofotometru ELx800 (*Bio-Tek® Instruments*, Winooski, USA), przy pojedynczej długości fali 450 nm. Uzyskane podczas badań wartości wzorca ujemnego wynosiły  $0,059 \pm 0,001$  (zakres 0,057 – 0,060), natomiast dla kontroli wysoko dodatniej mieściły się one w zakresie 0,995 – 1,024 ( $1,007 \pm 0,015$ ). Zgodnie z zaleceniami producenta, wyniki były interpretowane jako dodatnie, jeżeli wartość gęstości optycznej analizowanej próbki pacjenta była wyższa o 0,1 od średniej wartości  $OD_{450}$  wzorcowej kontroli ujemnej dołączonej do zestawu. W badaniach przeprowadzonych w Klinice wartość cut-off wyznaczająca granicę między dodatnimi i ujemnymi wynikami reakcji wynosiła 0,159. Test wykrywał obecność antygenu HRP-2 *P. falciparum* przy niskiej parazytemii na poziomie 0,001%. Czulość i swoistość diagnostyczna zastosowanej metody badawczej została określona odpowiednio na 98,8% i 100%, a dodatnia i ujemna wartość predykcyjna testu wynosiła odpowiednio 100% i 99,8% (Noedl i wsp., 2006).

### **3.6. Zgodność badań klinicznych z zasadami etyki**

Warunkiem włączenia pacjentów do programu badań klinicznych było uzyskanie świadomej zgody na udzielanie świadczeń szpitalnych oraz wykonywanie zabiegów diagnostycznych i leczniczych, każdorazowo odnotowywane w dokumentacji medycznej szpitala, zgodnie z procedurami systemu zarządzania jakością wg normy ISO 9001. Zgoda dotyczyła pobrania krwi z opuszki palca, celem wykonania badania grubej kropli i cienkiego rozmazu krwi obwodowej na obecność zarodźców zimnicy i testów immunochromatograficznych w kierunku antygenów *Plasmodium* spp. oraz pobrania krwi żyłnej do przeprowadzenia testu immunoenzymatycznego wykrywającego swoisty antygen HRP-2 *P. falciparum*.

Procedura wykonywania badań objętych tematyką rozprawy doktorskiej była zgodna z ogólnie zaakceptowanymi zasadami prowadzenia badań klinicznych (ang. *Good Clinical Practice*), opracowanymi w oparciu o Deklarację Helsińską, co potwierdziła Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, wyrażając pisemną zgodę na przeprowadzenie powyższych badań.

### **3.7. Analiza statystyczna wyników badań**

Ocenę statystyczną wyników badań przeprowadzano w oparciu o test niezależności  $\chi^2$ , test T – Studenta, współczynnik korelacji rang Spearmana oraz podstawowe funkcje statystyczne (średnia arytmetyczna, odchylenie standardowe, wariancja), posługując się komputerową analizą bazy danych przy użyciu polskiej wersji programu Statistica 6.0 PL firmy StatSoft® Polska oraz Microsoft Excel 2000, uznając za statystycznie istotne wartości  $P < 0,05$  przy poziomie ufności 95%.

### **3.8. Dokumentacja fotograficzna wyników badań**

Zdjęcia preparatów zarodźców zimnicy, uzyskanych w trakcie wykonywania bezpośrednich badań parazytologicznych krwi obwodowej pacjentów z malarią, hospitalizowanych w Klinice Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, wykonywano spod mikroskopu świetlna-fluorescencyjnego typu Axioskop (Zeiss, Niemcy) przy użyciu filmu Kodak Ultra Gold 100 w powiększeniu 1000-krotnym, w Pracowni Parazytologicznej Katedry.

## 4. WYNIKI

### 4.1. Częstość występowania malarii wśród osób powracających do Polski z krajów odmiennej strefy klimatyczno-sanitarnej

Osoby powracające z krajów odmiennej strefy geograficzno-środowiskowej i sanitarno-higienicznej stanowiły istotną i wzrastającą z każdym rokiem populację pacjentów hospitalizowanych i konsultowanych w Klinice. W okresie od stycznia 2001 roku do października 2012 roku, do Kliniki Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych w Poznaniu przyjęto 947 chorych z dolegliwościami klinicznymi po podróży z obszarów strefy gorącej, z czego 41,6% stanowili misjonarze pracujący w krajach rozwijających się o skromnym poziomie ekonomicznym i trudnych warunkach klimatycznych. Najczęstszą przyczyną hospitalizacji były stany gorączkowe (70,3%) oraz zakażenia i zarażenia przewodu pokarmowego po powrocie z obszarów tropikalnych (20,8%), głównie pełzakowica, giardioza, strongyloidoza, cyklosporoza i biegunki infekcyjne, zwłaszcza u osób nie przestrzegających zasad higieny tropikalnej. Pacjenci z ostrą lub przebytą malarią stanowili 30,0% wszystkich osób leczonych w Klinice po powrocie z tropiku oraz 42,6% chorych kierowanych do Ośrodka Poznańskiego z powodu wysokiej gorączki związanej z podróżami zagranicznymi. Do rzadszych przyczyn hospitalizacji z powodu tropikalnych pasożytów i chorób infekcyjnych należała gorączka krwotoczna denga (n=29), egzotyczne choroby skóry, jak np. stopa madurska, zespół larwy wędrującej skórnej, leiszmanioza skórna, dirofilariozy, tungiaza, czy też muszyce skóry (n=31), schistosomozy przewodu pokarmowego i układu moczowego (n=17), filariozy układu limfatycznego oraz narządu wzroku i tkanki podskórnej, przeważnie u misjonarzy powracających z Afryki i Indii (n=11), pełnoobjawowa leiszmanioza trzewna (kala-azar) (n=7), ropnie pełzakowe wątroby (n=4), choroba Chagasa (n=3), dur brzuszny i dury rzekome (n=3), riketsjozy (n=3) oraz pierwszy w Polsce i Europie środkowo-wschodniej przypadek śpiączki afrykańskiej zakończony sukcesem terapeutycznym (n=1). W okresie objętym tematyką rozprawy doktorskiej, w Klinice nie notowano żadnych zgonów z powodu tropikalnych, ani też rodzimych inwazji pasożytniczych.



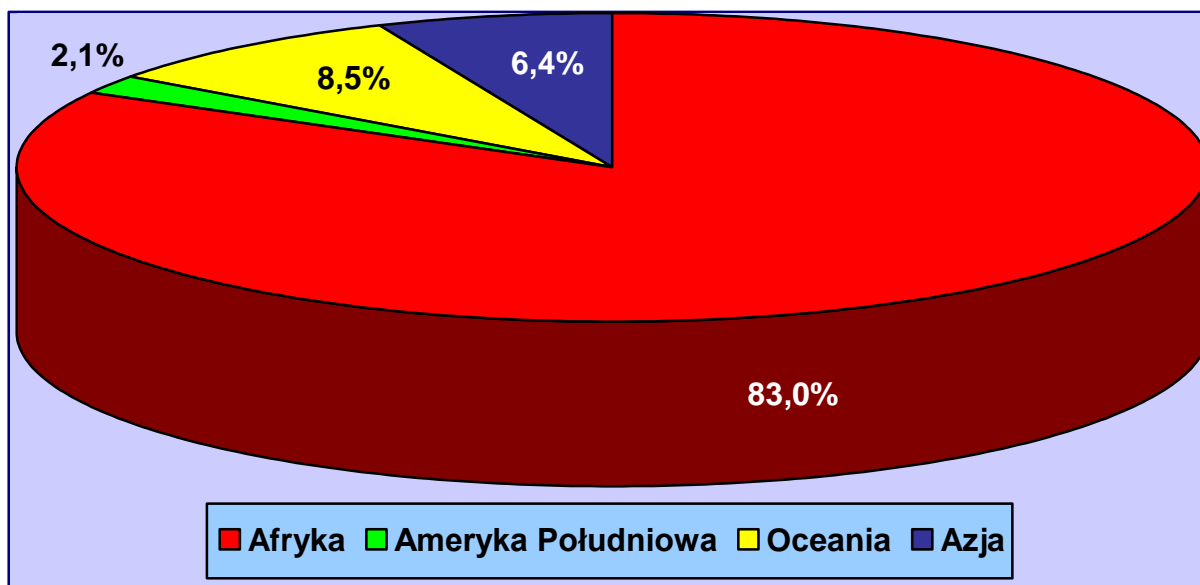
## 4.2. Określenie czynników ryzyka zarażenia *Plasmodium* spp. u badanych pacjentów

Spośród 47 pacjentów hospitalizowanych w Klinice z potwierdzeniem malarii, 39 osób (83,0%) zaraziło się zarodźcem zimnicy podczas pobytu w Afryce Subsaharyjskiej, w tym najwięcej pacjentów powracało z wyprawy do Kamerunu i Ghany (po 5 osób), Nigerii (4 osoby) oraz Ugandy, Zambii i Gabonu (po 3 osoby). Wśród 39 pacjentów przebywających w krajach afrykańskich, najwięcej osób uległo zarażeniu *Plasmodium* spp. w Afryce Środkowej (n=19), przede wszystkim na obszarze Nigerii, Kamerunu, Gabonu, Republiki Środkowoafrykańskiej, Ugandy i Rwandy w porównaniu do mniej licznych pacjentów powracających z Afryki Zachodniej (n=7), Afryki Wschodniej (n=7), czy też Afryki Południowej (n=6) (test  $\chi^2$ ,  $P < 0,000001$ ). Jedna osoba z grupy badanej (2,1%) przebywała w Ameryce Południowej (Brazylia), cztery osoby (8,5%) powróciły z wysp Oceanii (Papua-Nowa Gwinea), natomiast troje pacjentów (6,4%) podróżowało do krajów Azji Południowo-Wschodniej (Indonezja) (Ryc. 15 i 16). Wszyscy pacjenci grupy badanej przebywali na obszarach endemicznego występowania malarii; 46 pacjentów podróżowało do krajów strefy międzyzwrotnikowej (97,9%), a jeden pacjent – przebywał w rejonie subtropikalnym (Republika Południowej Afryki). Przypadki malarii importowanej z Subkontynentu Afrykańskiego, obserwowano znacznie częściej, niż z innych rejonów geograficznych świata (test  $\chi^2$ ,  $P < 0,000001$ ).

Czterech pacjentów wielokrotnie hospitalizowanych w Klinice z powodu licznych epizodów malarii (3 osoby – trzykrotnie, jedna osoba – dwukrotnie), było leczonych z powodu reaktywacji przebytej wcześniej inwazji wywołanej przez *P. vivax* i nieskutecznej eradykacji wewnątrzwątrobowych hypnozoitów w warunkach ambulatoryjnych, a nie nowego zarażenia nabywanego podczas kolejnej podróży do strefy tropikalnej. Byli to pacjenci powracający z Brazylii, Wybrzeża Kości Słoniowej, Papui-Nowej Gwinei oraz wysp Indonezji.

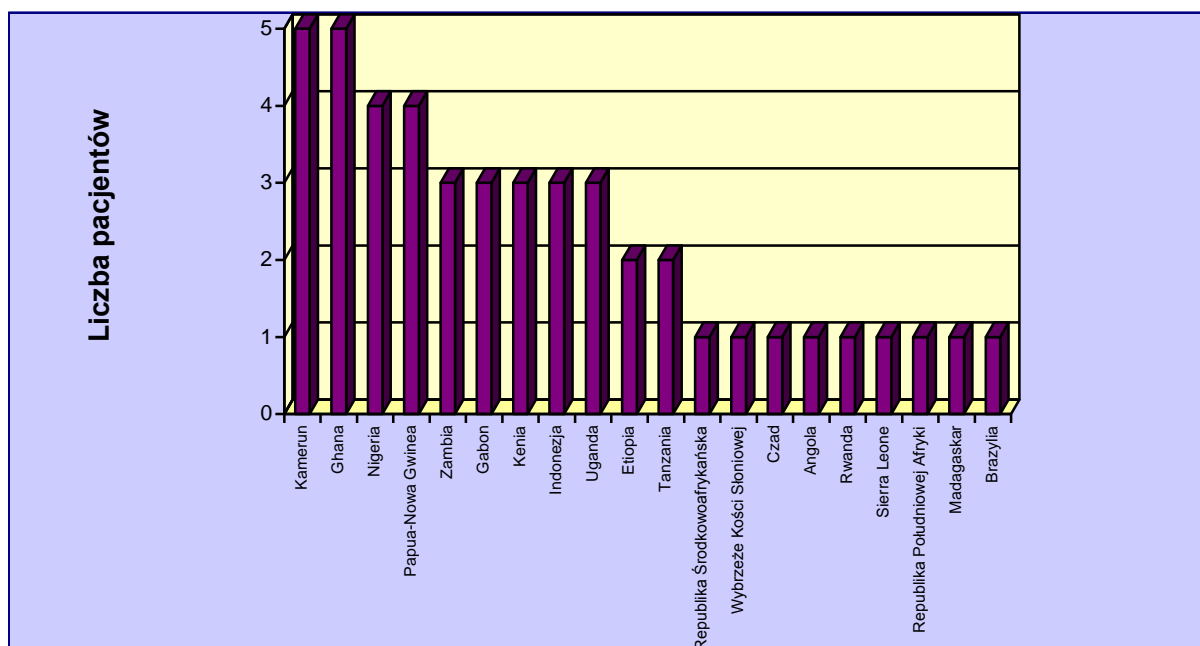
Głównym celem podróży pacjentów tworzących grupę badaną był wyjazd do pracy w krajach strefy międzyzwrotnikowej i subtropikalnej, gdyż ponad połowa badanych (51,1%) przebywała w krajach endemicznego występowania malarii w celach zawodowych (n=24). Blisko 1/3 pacjentów (27,7%) wyjechała do tropiku do pracy w ośrodkach misyjnych i placówkach humanitarnych (n=13) i podobna liczba osób (n=11) brała udział w podróży służbowej o innym charakterze niż praca misyjna

i humanitarna (23,4%), najczęściej prowadząc prace geodezyjno-inżynierskie związane z poszukiwaniem złóż surowców naturalnych oraz wydobywaniem ropy naftowej i gazu ziemnego, prowadząc negocjacje biznesowe z kontrahentami, uczestnicząc w sympozjach szkoleniowych, a także biorąc udział w obsłudze ruchu turystycznego. Tylko w sporadycznych przypadkach obserwowano zachorowania na malarię podczas odbywania służby wojskowej w ramach misji stabilizacyjnych (n=1).

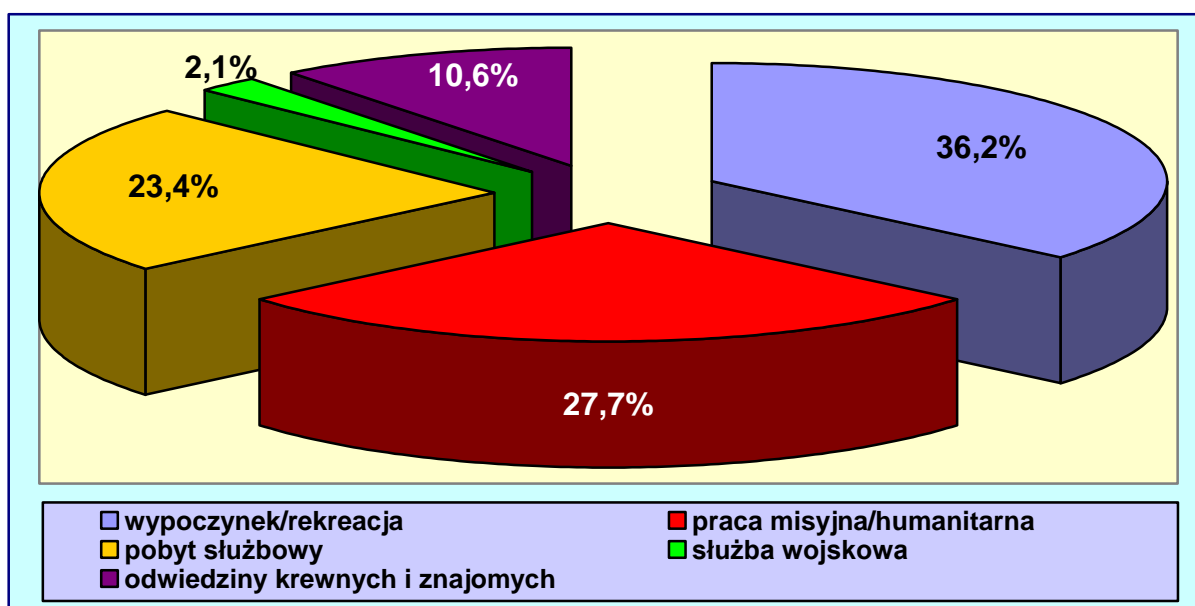


Ryc. 15. Docelowy kontynent podróży pacjentów hospitalizowanych lub konsultowanych w Klinice, u których potwierdzono malarię (n=47).

Wypoczynek i rekreacja nie były aktualnie głównym celem podróży tropikalnej dla polskich pacjentów zarażonych *Plasmodium* spp., gdyż tylko 36,2% badanych przebywało w tropiku w celach turystycznych (n=17). W grupie badanej znalazły się także osoby, które przebywając okresowo w Polsce w celach edukacyjnych lub zarobkowych odwiedzały po latach swoich krewnych i przyjaciół w tropiku (n=4) lub też mieszkały na stałe na obszarach tropikalnych, a odbywały podróż biznesową w naszym kraju (jeden imigrant z Kenii). Wykazano statystycznie istotną różnicę, między liczbą pacjentów nabywających malarię podczas pracy w tropiku, a liczbą osób zarażających się zarodźcem zimnicy w czasie wyjazdu o charakterze turystycznym (test  $\chi^2$ ,  $P = 0,03$ ) (Ryc. 17).



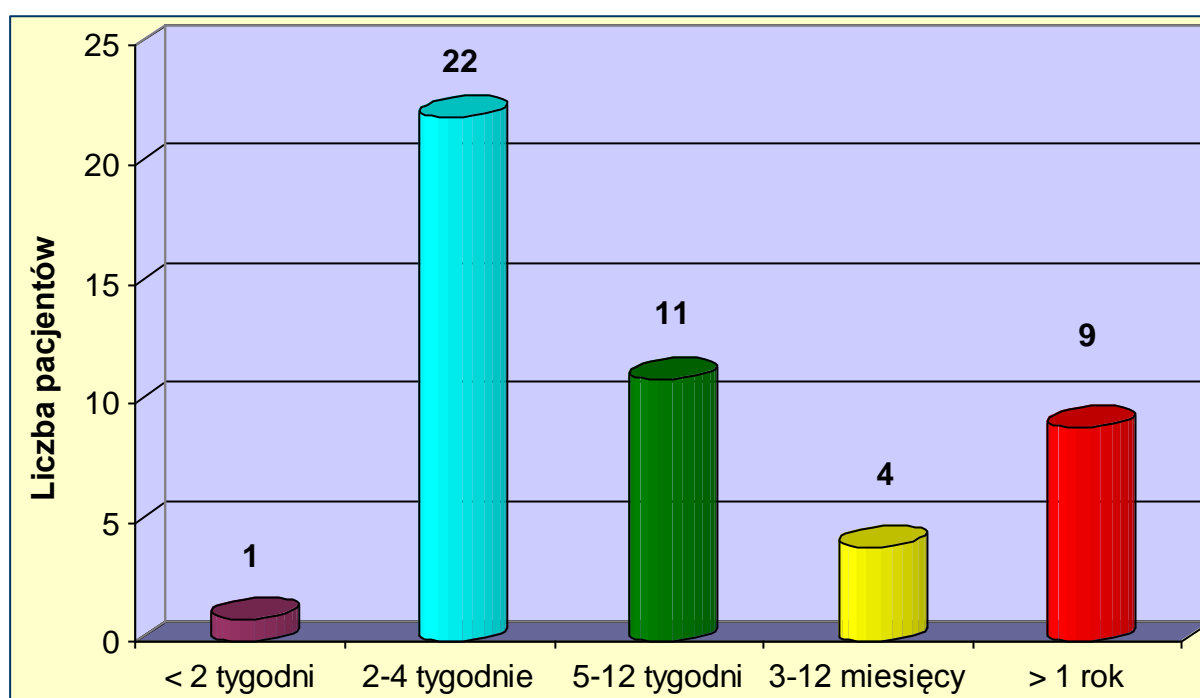
Ryc. 16. Kraje docelowe podróży pacjentów hospitalizowanych lub konsultowanych w Klinice, u których potwierdzono malarię (n=47).



Ryc. 17. Cel podróży pacjentów hospitalizowanych lub konsultowanych w Klinice, u których potwierdzono malarię (n=47).

Pacjenci grupy badanej przebywali w krajach endemicznego występowania malarii przez bardzo zróżnicowany okres czasu od 1 tygodnia do 56 lat, a średni czas pobytu w krajach strefy międzyzwrotnikowej i subtropikalnej pacjentów z malarią

hospitalizowanych w Ośrodku Poznańskim wynosił 207 tygodni. Najwięcej pacjentów z tej grupy (n=21) przebywało w krajach gorących od 2 do 4 tygodni (44,7%). Szczególną grupę osób stanowili misjonarze, wolontariusze akcji humanitarnych i inni pracownicy ośrodków misyjnych (n=13), którzy pracowali w strefie endemicznego występowania zimnicy od 3 tygodni do 30 lat (średnio 462 tygodnie). Osobą, która najkrócej przebywała w strefie endemicznego występowania malarii był student medycyny Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu pochodzenia afrykańskiego, który po 18 latach nieobecności w swoim rodzinnym kraju, odbył 7-dniową podróż do Ghany w celu odwiedzin najbliższej rodziny (Ryc. 18).



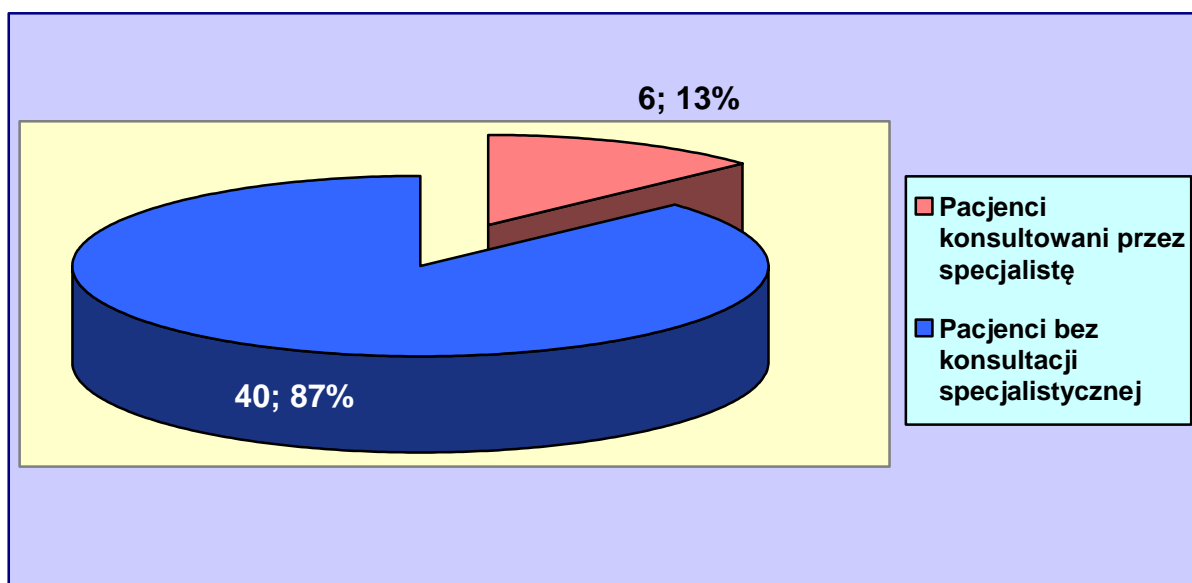
**Ryc. 18. Długość pobytu w strefie endemicznej pacjentów z ostrą malarią potwierdzoną w Klinice (n=47).**

Dla 15 osób z grupy badanej był to pierwszy wyjazd do krajów odmiennej strefy klimatyczno-sanitarnej (31,9%), jednak większość pacjentów posiadała już pewne doświadczenie w podróżowaniu do krajów strefy gorącej związane z wcześniejszymi wyjazdami lub mieszkaniem w tropiku (68,1%). Wywiad w kierunku przechorowania zimnicy w przeszłości, podczas pobytu w krajach endemicznych był dodatni u 21 pacjentów (44,7%); należeli do nich przede wszystkim misjonarze pracujący od wielu

lat w trudnych warunkach klimatyczno-środowiskowych w strefie tropikalnej (n=10; 21,3%) oraz imigranci przebywający okresowo lub na stałe w Polsce (n=5; 10,6%).

Liczba pacjentów, którzy skorzystali z profesjonalnej konsultacji u lekarza specjalisty chorób tropikalnych lub medycyny podróży, dotyczącej profilaktyki zdrowotnej przed i w czasie wyjazdu była niska (n=6) (Ryc. 19). Wpłynęło to niekorzystnie na sposób przygotowania medycznego do wyjazdu i zdecydowanie zwiększyło ryzyko zachorowania na malarię, gdyż osoby przygotowujące się do wyjazdu samodzielnie, albo dobierały niewłaściwy dla danej strefy geograficznej lek przeciwmalaryczny, który stosowały w celu zapobiegania zimnicy, albo nie stosowały w ogóle farmakologicznej profilaktyki przeciwmalarycznej. Ponadto, jeden z pacjentów, mimo zaleceń specjalisty medycyny tropikalnej nie stosował skutecznego leku przeciwmalarycznego.

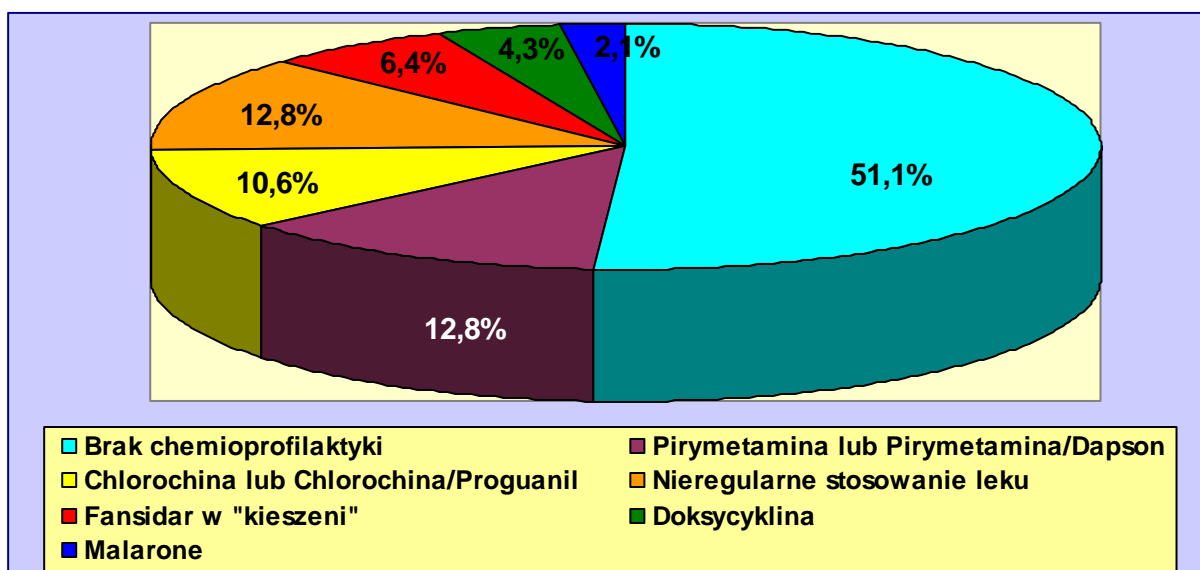
Rekomendacje dotyczące konieczności odbycia konsultacji przed wyjazdem do strefy tropikalnej nie dotyczyły jednego pacjenta, który był imigrantem z Kenii i przyjechał do Polski w celach zawodowych na 2 tygodnie.



**Ryc. 19. Częstość wykonywania konsultacji lekarskich u specjalisty medycyny podróży przed wyjazdem do krajów strefy tropikalnej wśród 46 pacjentów, u których potwierdzono malarię w Ośrodku Poznańskim.**

Odsetek osób z grupy badanej, które stosowały właściwą dla danej strefy geograficznej profilaktykę przeciwmalaryczną w postaci doksycykliny (n=2) lub

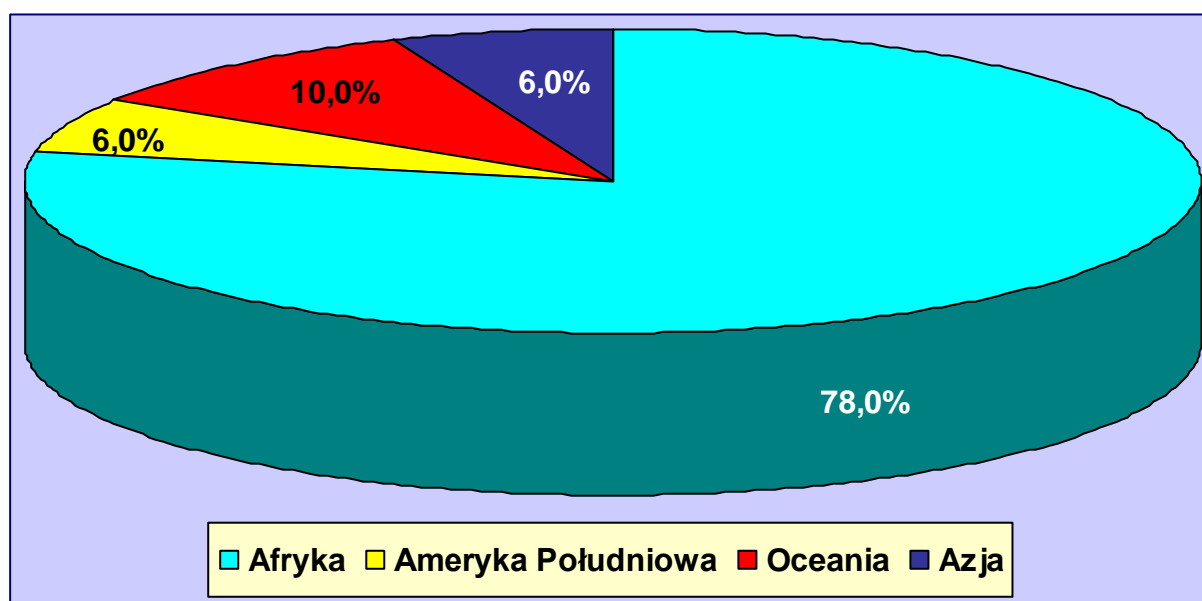
połączenia atowakwonu z proguanilem (Malarone) (n=1) był bardzo niski i wynosił jedynie 6,4% (n=3). Ponad połowa pacjentów z malarią rozpoznaną w Ośrodku Poznańskim (n=24) nie stosowała żadnej farmakologicznej profilaktyki przeciwmalarycznej (51,1%), a 29,8% osób stosowało leki nieskuteczne w danym rejonie geograficznym (n=14). Do najczęstszych błędów w zakresie profilaktycznego pobierania preparatów w kierunku malarii, które były właściwie dobrane przez lekarza (12,8% badanych) należało ich nieregularne przyjmowanie podczas pobytu w strefie endemicznego występowania zimnicy (Malarone lub Lariam) (n=3) lub zaprzestanie kontynuowania leku po powrocie z obszarów tropikalnych (n=3). Do nieskutecznych leków przeciwmalarycznych i ich kombinacji, pobieranych profilaktycznie przez pacjentów powracających z tropiku z zarażeniem *Plasmodium* spp. należały: chlorochina, chlorochina z proguanilem, pirymetamina lub pirymetamina z Dapsonem, albo pirymetamina z sulfadiazyną (Fansidar) w postaci „leku w kieszeni”, przyjmowanego w przypadku pojawienia się pierwszych objawów klinicznych zimnicy (Ryc. 20).



**Ryc. 20. Rodzaj stosowanej farmakologicznej profilaktyki przeciwmalarycznej u pacjentów hospitalizowanych lub konsultowanych w Klinice, u których potwierdzono zimnicę (n=47).**

Spośród 50 pacjentów grupy kontrolnej, u których nie stwierdzano ostrego zarażenia *Plasmodium* spp., najwięcej osób zgłaszało się na badania kontrolne do Kliniki po powrocie z ośrodków misyjnych w Afryce (78%), zwłaszcza Kamerunu,

Zambii, Czadu, Malawi, Republiki Środkowoafrykańskiej, Kongo, Togo i Madagaskaru, natomiast znacznie mniej misjonarzy (10%) przyjeżdżało z wysp Oceanii (Papua-Nowa Gwinea), Ameryki Południowej (Peru, Boliwia), czy też krajów azjatyckich, takich jak Rosja, Kazachstan, czy też Japonia (po 6%) (Ryc. 21). Podobnie jak w przypadku pacjentów grupy badanej, zdecydowana większość osób z grupy kontrolnej przebywała na obszarach tropikalnej Afryki, a liczba osób powracających z tego kontynentu była porównywalna w obu grupach (test  $\chi^2$ ,  $P = 0,3$ ). Misjonarze hospitalizowani w Klinice, pracowali w krajach afrykańskich znacznie częściej niż w Ameryce Łacińskiej (test  $\chi^2$ ,  $P < 0,000001$ ), Azji (test  $\chi^2$ ,  $P < 0,000001$ ), czy wyspach Dalekiego Pacyfiku (test  $\chi^2$ ,  $P < 0,000001$ ).



Ryc. 21. Docelowy kontynent podróży pacjentów grupy kontrolnej hospitalizowanych w Klinice, u których wykluczono malarię (n=50).

W grupie kontrolnej znajdowali się wyłącznie misjonarze i misjonarki, siostry zakonne i księża diecezjalni okresowo przebywających w tropiku w celu pracy duszpasterskiej oraz wolontariusze i osoby świeckie niosące pomoc humanitarną w krajach odmiennej strefy klimatyczno-sanitarnej. 46 badanych misjonarzy mieszkało w warunkach środowiskowych o istotnym ryzyku zagrożenia zarażeniem *Plasmodium* spp. (92%). Czas przebywania w strefie endemicznego występowania malarii, a więc okres potencjalnej ekspozycji na zarażenie *Plasmodium* spp. był dla tych osób zdecydowanie dłuższy niż w przypadku pacjentów grupy badanej (test T-Studenta,  $P$

= 0,00002) i wahał się on od 2 miesięcy do 56 lat (średnio  $15,4 \pm 12,3$  lat), uwzględniając dwóch imigrantów Afryki, którzy przebywali w strefie tropikalnej przez całe swoje życie.

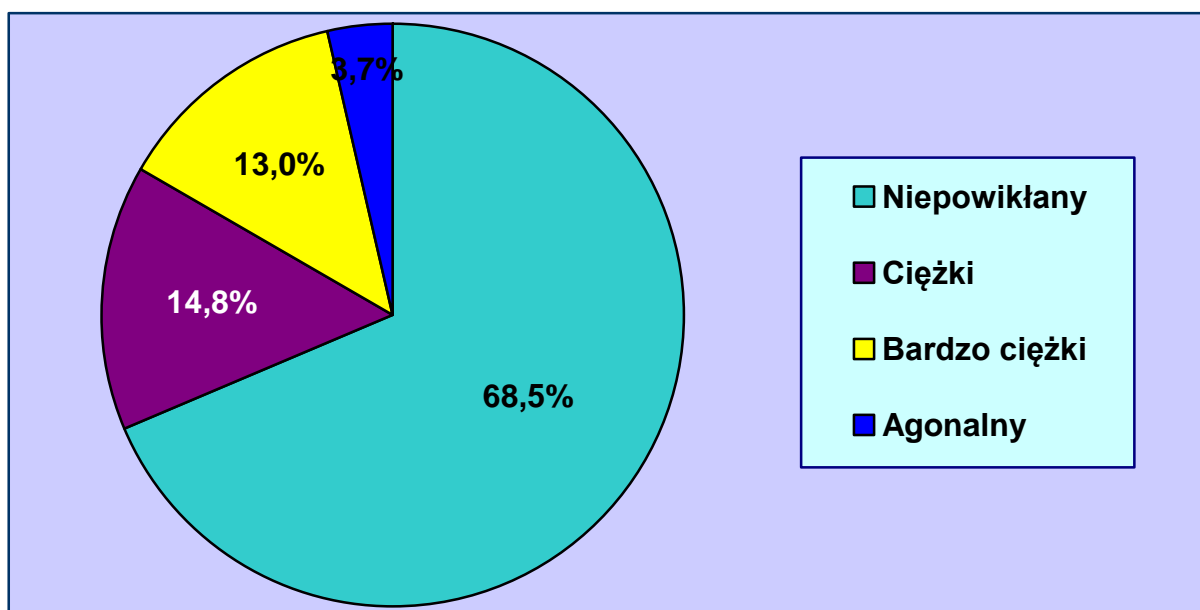
Pacjenci grupy kontrolnej byli przygotowywani do wyjazdu przez Centrum Formacji Misyjnej w Warszawie, gdzie uczestniczyli w cyklicznych seminariach szkoleniowych na temat zagrożeń zdrowotnych występujących w odwiedzanych rejonach geograficznych i zasad bezpiecznego zachowania się w odmiennych warunkach klimatycznych i środowiskowych, prowadzonych przez pracowników Katedry Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Wszyscy misjonarze odbywali specjalistyczne konsultacje lekarskie w zakresie przygotowania medycznego do wyjazdu oraz ochrony zdrowia w tropiku. Ze względu na długi okres pracy w krajach pozaeuropejskich i konieczność wytworzenia częściowej odporności przeciwmalarycznej (ang. *antimalarial semi-immunity*), misjonarze nie stosowali farmakologicznej profilaktyki przeciwmalarycznej przez cały okres przebywania w tropiku. Aż 42 spośród 50 osób grupy kontrolnej chorowało w przeszłości na malarię podczas pobytu w strefie endemicznej (84%).

#### **4.3. Ocena stanu klinicznego badanych pacjentów**

Kryteria kliniczne i laboratoryjne opracowane przez Światową Organizację Zdrowia posłużyły do podziału przypadków zarażonych *Plasmodium* spp. na 4 grupy, w zależności od charakteru przebiegu klinicznego zimnicy i stopnia nasilenia objawów chorobowych. Spośród 54 przypadków malarii hospitalizowanych lub konsultowanych w Ośrodku Poznańskim, u 37 pacjentów zaobserwowano niepowikłany przebieg zimnicy (68,5%), u 8 osób przebieg ciężki (14,8%), a u 7 chorych bardzo ciężki (13,0%) (Ryc. 22). **U pacjentów z ciężką postacią choroby stwierdzano co najmniej jeden z markerów klinicznych lub laboratoryjnych powikłanej zimnicy (patrz Tabela II, podrozdział 3.4.). Pacjenci z bardzo ciężką formą zarażenia prezentowali co najmniej trzy objawy powikłanej malarii wg Światowej Organizacji Zdrowia oraz spełniali co najmniej jedno z klinicznych (np. niewydolność wielonarządowa, zapaść naczyniowa, śpiączka) i laboratoryjnych (np. hemozoina w leukocytach lub schizonty *P. falciparum* we krwi obwodowej) kryteriów zimnicy o przebiegu krytycznym, o poważnym i niepewnym rokowaniu klinicznym (patrz Tabela III, podrozdział 3.4.). Dwoje**



spośród 3 pacjentów hospitalizowanych na oddziałach chorób zakaźnych w innych ośrodkach w Polsce zmarło (3,7%) z powodu wielonarządowych powikłań w przebiegu zimnicy. Malaria została potwierdzona u tych osób na podstawie przesłanych do oceny mikroskopowej preparatów cienkich rozmazów krwi obwodowej. U żadnego z 51 pacjentów hospitalizowanych w Klinice nie stwierdzano odległych następstw, ani powikłań po przebytej malarii.

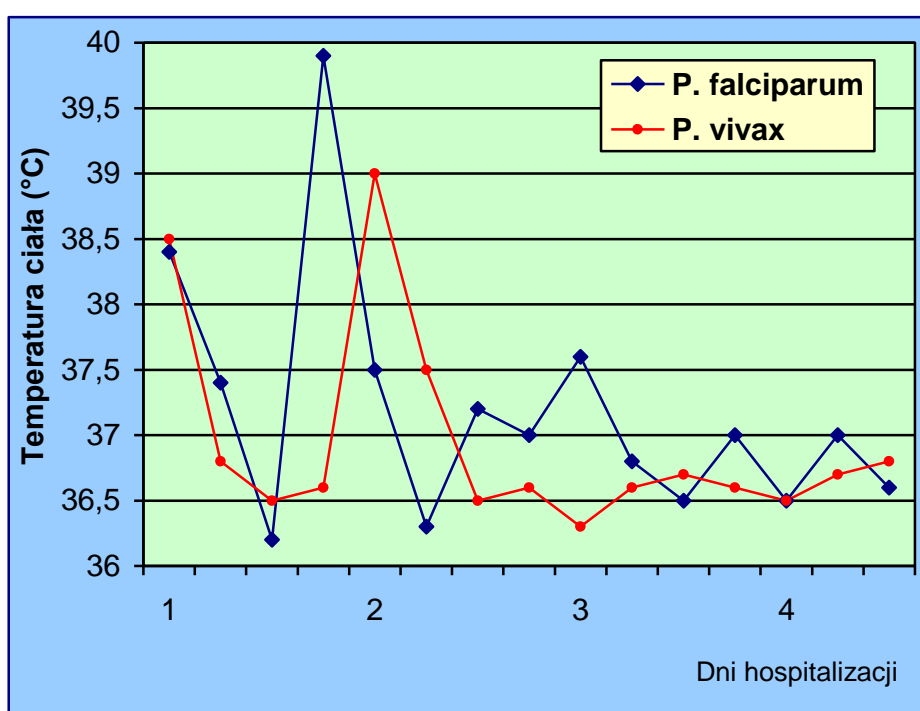


**Ryc. 22. Klasyfikacja przebiegu klinicznego przypadków malarii hospitalizowanych lub konsultowanych w Klinice (n=54).**

Pacjenci z grupy badanej byli przyjmowani do szpitala w trybie nagłym z powodu gorączki do 40°C poprzedzonej dreszczami (Ryc. 23), uczucia zimna, złego samopoczucia, znacznego osłabienia ogólnego i wzmożonej potliwości, które występowały we wszystkich przypadkach malarii. Gorączka miała przeważnie charakter nieregularny, często występowała wielokrotnie w ciągu doby, a tylko w jednym przypadku pojawiała się w sposób nawracający co 3-4 dni (pacjent zarażony *P. malariae*). U misjonarzy i wolontariuszy akcji humanitarnych gorączka zwykle nie przekraczała 39°C i nierzadko obserwowano jedynie stany podgorączkowe, bóle mięśni i objawy ogólnego rozbicia.

Drugim najczęstszym objawem, który zanotowano u 23 pacjentów był silny ból głowy (42,6%), któremu u 4 osób towarzyszyły zawroty głowy (7,4%), a u 13 chorych uporczywe nudności i/lub wymioty świadczące o niedotlenieniu przewodu pokarmowego (24,1%). Dolegliwości gastroenterologiczne w postaci bólów brzucha i

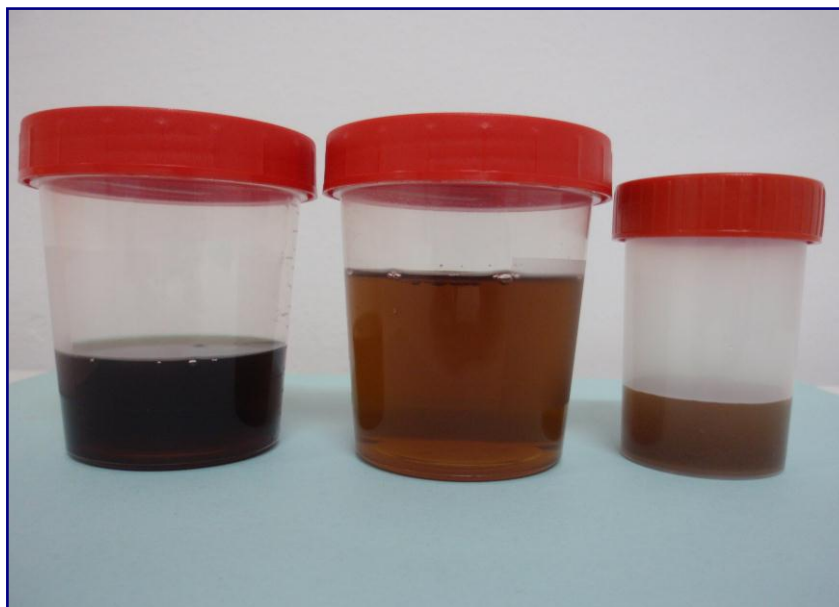
luźnych wypróżnień występowały w 10 przypadkach (18,5%). Pacjenci z malarią hospitalizowani lub konsultowani w Ośrodku Poznańskim zgłaszali także objawy ze strony układu oddechowego: u 4 osób był to suchy kaszel (7,4%), a u kolejnych ośmiu - objawy duszności (14,8%). Ciemne zabarwienie moczu w kolorze popłuczyn mięsnych (tzw. czarnomocz zimniczy) zaobserwowano u 8 chorych (14,8%) (Ryc. 24). Do najrzadszych dolegliwości należał przemijający cinchonizm, który zgłosiło dwóch pacjentów po leczeniu chininą (3,7%). Charakter dolegliwości klinicznych występujących u pacjentów z malarią, hospitalizowanych lub konsultowanych w Klinice zestawiono na Rycinie 25.



Ryc. 23. Przykładowy przebieg toru gorączkowego u pacjentów z malarią *P. falciparum* i *P. vivax* hospitalizowanych w Klinice.

Pacjenci z ostrym epizodem malarii zgłaszali się do Kliniki między pierwszą a czternastą dobą od momentu pojawienia się objawów klinicznych choroby (średnia  $3,9 \pm 3,0$  dnia). W pierwszej dobie trwania objawów klinicznych zimnicy do Kliniki trafiło tylko 10 pacjentów (18,5%), w 2 i 3 dobie gorączki skierowano 21 osób (38,9%), w czwartej dobie została przyjęta jedna osoba (1,9%), natomiast najczęściej pacjentów było kierowanych do szpitala powyżej 4 doby trwania objawów chorobowych (40,7%). Najpóźniej był przekazany do Kliniki misjonarz z

niepowikłanym zarażeniem *P. vivax*, który trafił do szpitala w 14 dobie objawów klinicznych oraz pacjent z zimnicą wywołaną przez *P. malariae* o niewielkiej parazytemii (poniżej 0,0001%), który został przyjęty w 10 dobie trwania nawracających stanów gorączkowych.



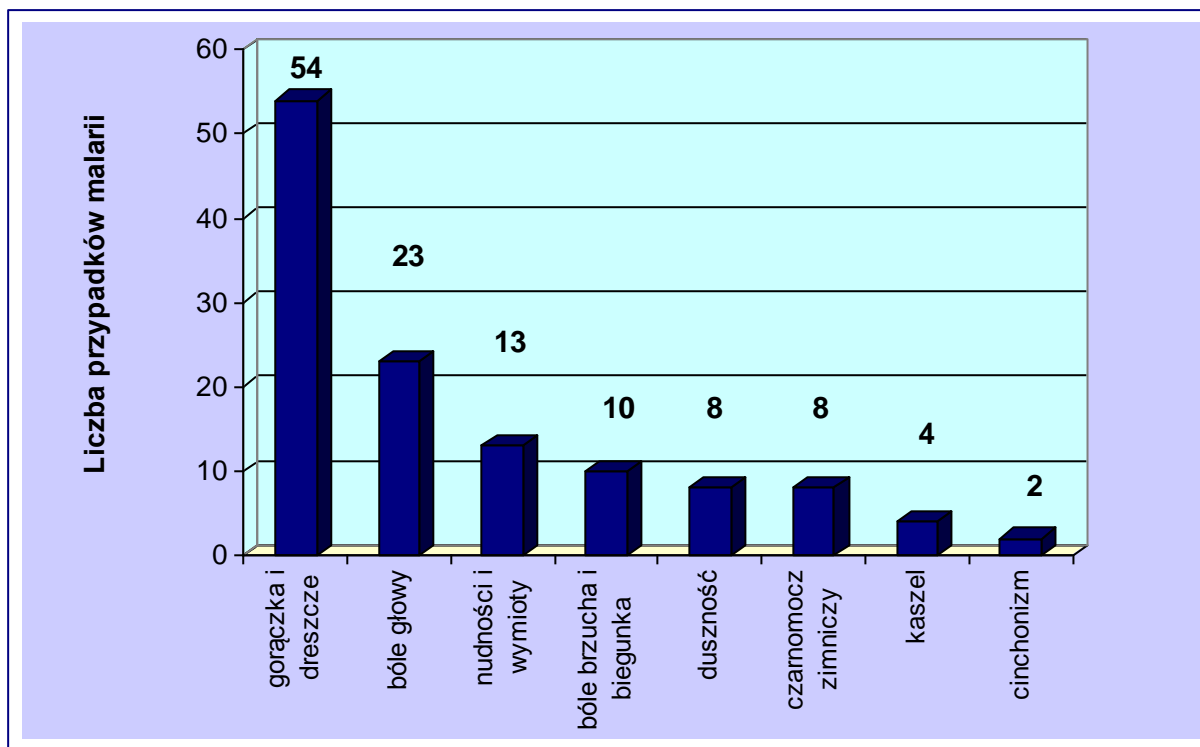
**Ryc. 24. Czarnomocz zimniczy jako niekorzystny marker prognostyczny powikłanej malarii. Kolekcja własna Kliniki.**

Najczęstszym objawem klinicznym stwierdzanym w badaniu przedmiotowym była hepatosplenomegalia: jednoczesne powiększenie wątroby i śledziony zanotowano u 10 pacjentów (18,5%), izolowaną splenomegalię stwierdzono u 22 chorych (40,7%), a hepatomegalię u jednego pacjenta (1,8%).

Kolejnym odchyleniem stwierdzanym podczas badania fizykalnego pacjentów z malarią była zmiana koloru powłok ciała i błon śluzowych: u 12 pacjentów zaobserwowano zażółcenie powłok ciała i twardówek (22,2%), w dwóch przypadkach wystąpiła sinica obwodowa (3,7%), a czterech pacjentów prezentowało objawy skazy krwotocznej w przebiegu pełnobjawowego zespołu wykrzepiania śródnaczyniowego (DIC), w postaci wybroczyn i rozległych wylewów na skórze, cech samoistnego krwawienia z błon śluzowych jamy ustnej i dziąseł oraz przedłużonego krwawienia z miejsc wkłucia dożylnego (7,4%).

Dzięciu pacjentów wykazywało suchość błon śluzowych jamy ustnej świadcząca o odwodnieniu (16,7%), które mogło być przyczyną obniżonego ciśnienia

krwi obwodowej u 5 chorych (9,3%) oraz omdlenia u jednego pacjenta (1,8%). U jednej pacjentki hospitalizowanej w Klinice wykryto powiklaną postać ciężkiej malarii przebiegającej z zapaścią naczyniową (ang. „*algid malaria*”).



**Ryc. 25. Dolegliwości kliniczne zgłaszane przez pacjentów z malarią, hospitalizowanych lub konsultowanych w Klinice (n=54).**

W 12 przypadkach stwierdzono zaburzenia świadomości o różnym stopniu nasilenia objawów klinicznych (22,2%): od niewielkiego splątania, aż do stanu głębokiej śpiączki (n=1) w przebiegu niedotlenienia ośrodkowego układu nerwowego w pełnoobjawowej malarii mózgowej. Pacjentka z ciężką malarią mózgową wywołaną przez *P. falciparum* hospitalizowana w Ośrodku Poznańskim po powrocie z Gabonu i Kamerunu, oprócz leczenia przeciwpasożytniczego i objawowego, wymagała transfuzji wymiennej krwi oraz oddechu kontrolowanego i utrzymywania podstawowych funkcji życiowych przez okres 4 dni.

Do kolejnych objawów stwierdzanych w badaniu klinicznym należały cechy niewydolności nerek w postaci oligurii i/lub hemoglobinurii, które zaobserwowano w 9 przypadkach zimnicy (16,7%). Niewydolność nerek rozpoznano ponadto u trzech kolejnych pacjentów, którzy nie prezentowali objawów klinicznych, a jedynie

zaburzenia w badaniach laboratoryjnych. Wszyscy pacjenci z niewydolnością nerek hospitalizowani w Klinice otrzymywali leczenie objawowe i żaden z nich nie wymagał hemodializoterapii.

Objawy niewydolności oddechowej w postaci siedzącej pozycji ciała, wciągania międzyżebry oraz przyspieszonego i splotonego oddechu wystąpiły u 9 pacjentów z malarią (16,7%); pięciu z nich wymagało wentylacji mechanicznej przy współpracy z oddziałem intensywnej opieki medycznej (9,3%), natomiast tlenoterapia bierna była zastosowana w czterech pozostałych przypadkach (7,4%). U jednego pacjenta hospitalizowanego w Klinice wystąpiło ostre powikłanie w postaci obrzęku płuc (1,8%).

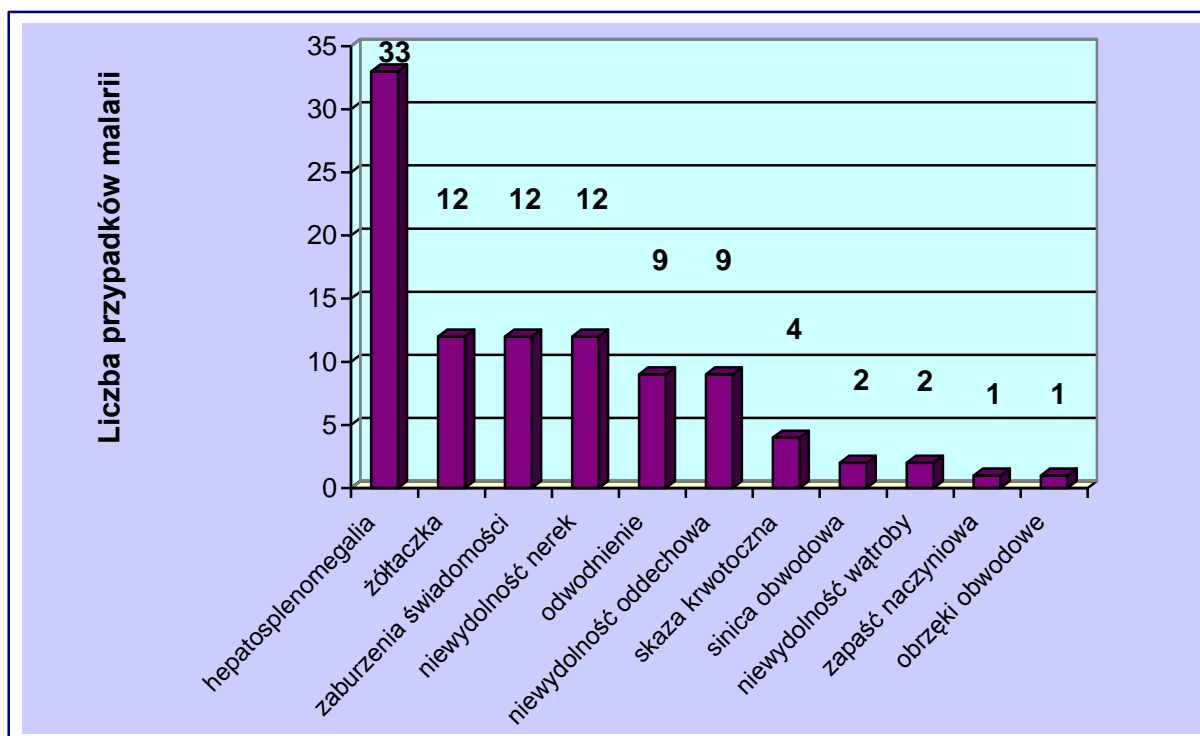
Do rzadszych objawów klinicznych należała niewydolność wątroby stwierdzana u 2 pacjentów (3,7%) oraz obrzęki obwodowe w jednym przypadku, u pacjenta z objawami posocznicy (sepsy) w przebiegu malarii (1,8%).

Pacjenci z potwierdzoną malarią byli hospitalizowani przez okres od 3 do 40 dni (średnio  $10,1 \pm 5,3$  dni). Podczas prowadzenia swoistej terapii przeciwpasożytniczej oraz intensywnego leczenia objawowego w Oddziale Klinicznym, stany gorączkowe utrzymywały się jeszcze u badanych pacjentów przez okres 0-9 dni (średnio  $2,5 \pm 1,9$  dni). Pacjenci z malarią o przebiegu ciężkim i bardzo ciężkim z powikłaniami ze strony wielu układów i narządów wewnętrznych gorączkowali dłużej niż chorzy z niepowikłaną postacią zimnicy (test T-Studenta,  $P = 0,0008$ ).

Zestawienie objawów klinicznych stwierdzanych w badaniu przedmiotowym u pacjentów z malarią, leczonych lub konsultowanych w Ośrodku Poznańskim przedstawia Rycina 26. Do najczęściej obserwowanych powikłań w przebiegu malarii u pacjentów gorączkujących po powrocie z tropiku, należały cechy niewydolności nerek z zaburzeniami świadomości oraz towarzyszącym zażółceniem powłok skórnych.

W ośmiu przypadkach zimnicy o ciężkim przebiegu klinicznym hospitalizowanych w Ośrodku Poznańskim, do aktualnie obowiązujących kryteriów powikłanej malarii wg Światowej Organizacji Zdrowia należały: niewydolność nerek i czarnomocz zimniczy ( $n=4$ ), zaburzenia świadomości ( $n=3$ ), żółtaczką ( $n=3$ ), ostra niewydolność oddechowa ( $n=2$ ), kwasica metaboliczna ( $n=1$ ) oraz pełnoobjawowy zespół wykrzepiania wewnątrznaczyniowego z cechami skazy krwotocznej ( $n=1$ ); u 6 chorych stwierdzano objawy niewydolności wielonarządowej (75,0%). U wszystkich pacjentów z ciężkim przebiegiem zimnicy potwierdzono inwazję wywołaną przez *P.*

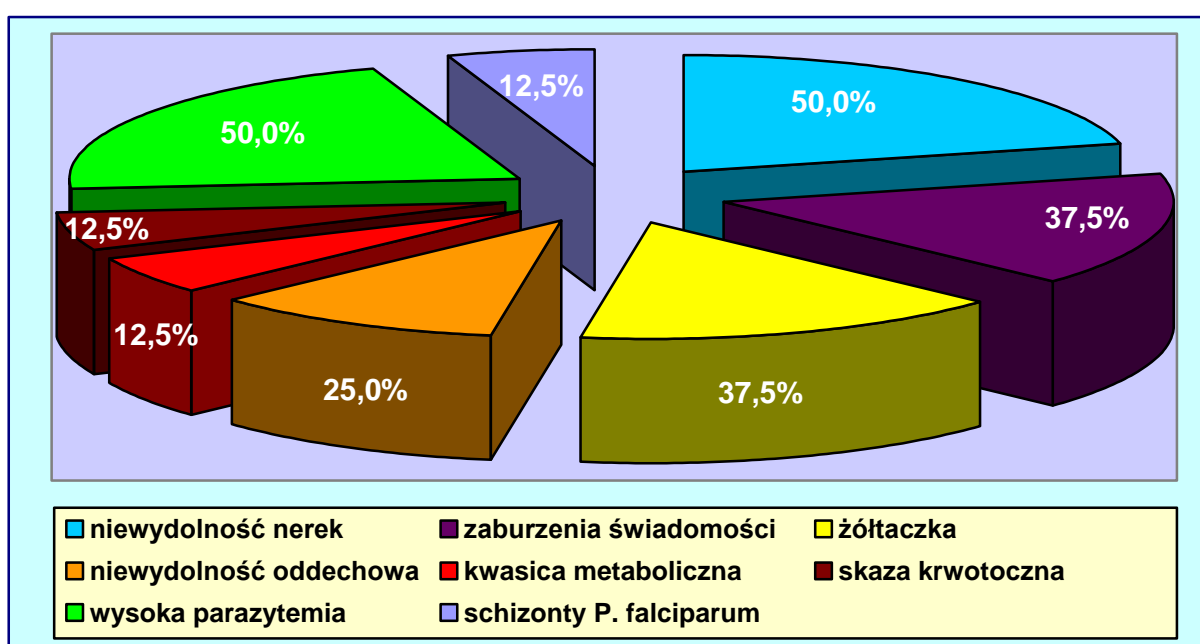
*falciparum*. Czwooro spośród 8 pacjentów spełniało dodatkowo kryteria parazytologiczne ciężkiej postaci inwazji (50%): obecność wysokiej parazytemii przekraczającej 2% oraz jednocześnie obecność schizontów zarodźca sierpowatego we krwi obwodowej u jednego z nich (Ryc. 27).



**Ryc. 26. Objawy kliniczne stwierdzone u pacjentów z malarią, hospitalizowanych lub konsultowanych w Klinice (n=54).**

Spośród 7 przypadków zimnicy o bardzo ciężkim przebiegu i poważnym rokowaniu klinicznym, sześć osób było hospitalizowanych w Klinice (85,7%), natomiast jedna pacjentka była leczona na oddziale chorób zakaźnych w województwie śląskim. Do kryteriów powikłanej malarii stwierdzanych u tych 7 chorych należały: niewydolność nerek z czarnomoczem zimniczym (n=5), zaburzenia świadomości lub malaria mózgowa (n=5), żółtaczką (n=5), ostra niewydolność oddechowa i/lub obrzęk płuc (n=5), kwasica metaboliczna (n=4), cechy skazy krwotocznej (n=3), niewydolność wątroby z wysoką hipertransaminazemią (n=2), zapaść naczyniowa (n=1) oraz głęboka niedokrwistość (n=1). W jednym przypadku stwierdzono aż sześć objawów niewydolności wielonarządowej (skaza krwotoczna, czarnomocz zimniczy, zaburzenia świadomości, zaburzenia oddychania, niewydolność wątroby i żółtaczką), u kolejnego pacjenta - pięć objawów dysfunkcji

wielonarządowej (czarnomocz zimniczy, zaburzenia świadomości, niewydolność oddechowa, niewydolność wątroby i żółtaczką), u trzech pacjentów - cztery kryteria powikłanej malarii (odpowiednio: malaria mózgowa, skaza krwotoczna, niewydolność nerek, żółtaczką oraz kwasica metaboliczna, głęboka niedokrwistość, niewydolność oddechowa, żółtaczką, a także zaburzenia świadomości, niewydolność nerek, skaza krwotoczna, niewydolność oddechowa), u jednej pacjentki konsultowanej w Klinice - trzy wykładniki ciężkiej zimnicy (zaburzenia świadomości, niewydolność nerek i zaburzenia oddychania), natomiast w pozostałym przypadku - jeden objaw kliniczny bezpośrednio zagrażający życiu (zapaść naczyniowa).

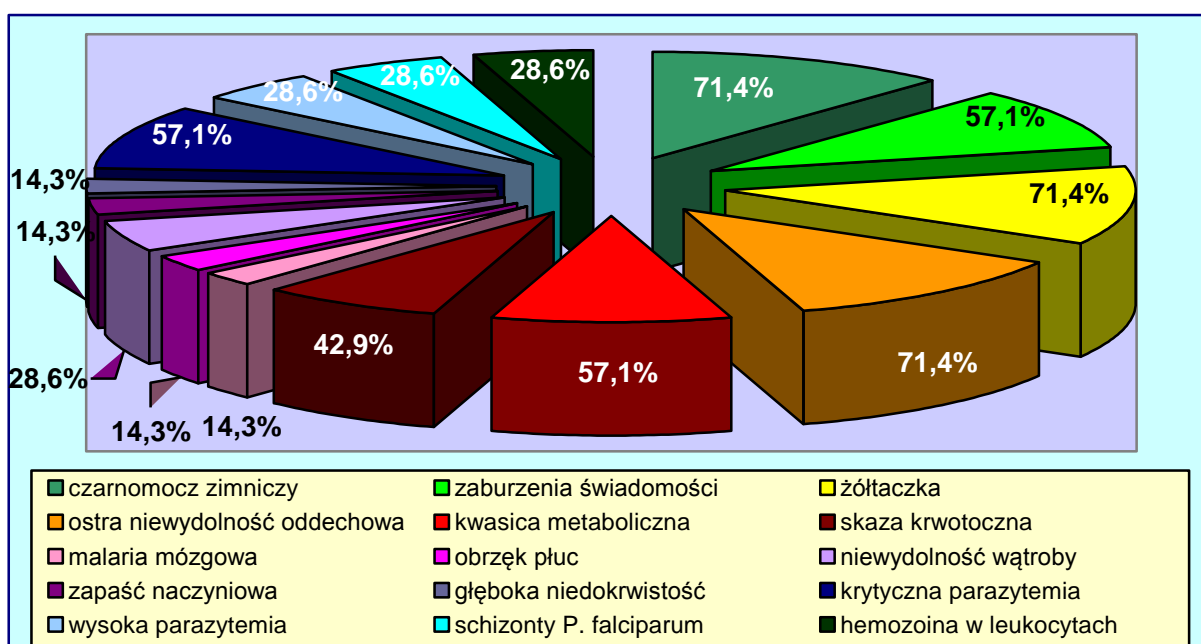


Ryc. 27. Wykładniki kliniczne i laboratoryjne powikłanej malarii u 8 pacjentów z ciężkim przebiegiem choroby, hospitalizowanych w Klinice.

Do niekorzystnych wykładników klinicznych i laboratoryjnych, świadczących o niepewnym rokowaniu u tych chorych należały: niewydolność wielonarządowa (n=6), zespół zaburzeń oddychania i obrzęk płuc (n=4), kwasica metaboliczna (n=4), wysoka hipertransaminazemia (n=2), śpiączka w przebiegu malarii mózgowej (n=1), zapaść naczyniowa (n=1), niskie stężenie antytrombiny III w pełnoobjawowym zespole wykrzepiania śródnaczyniowego (n=1) oraz głęboka niedokrwistość (n=1).

Sześciu spośród 7 pacjentów z bardzo ciężkim przebiegiem malarii, u których inwazję wywołało *P. falciparum* (85,7%) spełniało również kryteria parazytologiczne

powikłanej postaci zarażenia: krytyczna parazytemia przekraczająca 10% zarażonych erytrocytów (n=3) lub wysoka parazytemia >2% (n=3), obecność schizontów *P. falciparum* we krwi obwodowej (n=3) oraz złogi hemozoiny w granulocytach obojętnochłonnych (n=2); u 3 osób stwierdzono więcej niż jeden marker parazytologiczny powikłanej malarii. W pozostałym przypadku rozpoznano malarię wywołaną przez *P. vivax* z niewydolnością oddechową, wymagającą utrzymywania podstawowych funkcji życiowych i prowadzenia oddechu kontrolowanego przez okres 35 dni. Kryteria kliniczne i laboratoryjne powikłanej malarii zostały u tych 7 pacjentów zestawione na Rycinie 28.



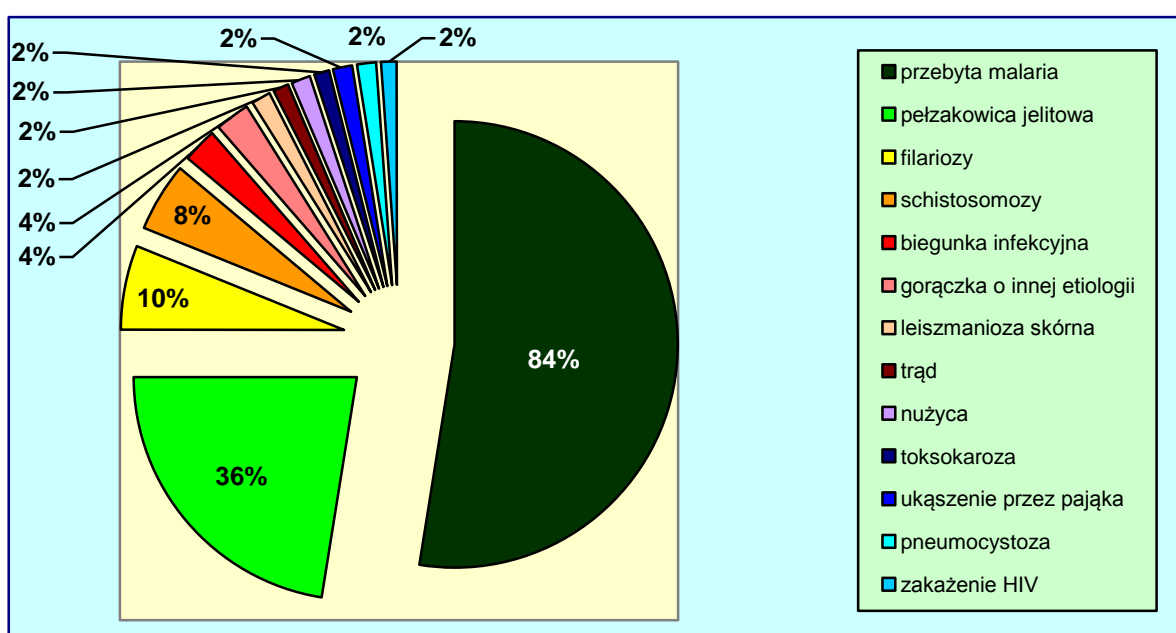
**Ryc. 28. Wykładniki kliniczne i laboratoryjne powikłanej malarii u 7 pacjentów z bardzo ciężkim przebiegiem choroby, hospitalizowanych lub konsultowanych w Klinice.**

Chorzy, którzy zmarli z powodu zimnicy w innych ośrodkach w Polsce (n=2), posiadali wykładniki kliniczne i laboratoryjne niewydolności wielonarządowej, a także parazytologiczne kryteria świadczące o ciężkiej postaci malarii i o bardzo złym rokowaniu: u obu pacjentów stwierdzono krytycznie wysoką parazytemię we krwi obwodowej oraz obecność złogów hemozoiny w krwinkach białych u jednego z nich.

U 50 misjonarzy z grupy kontrolnej wykluczono ostatecznie ostry epizod zimnicy, ale u 42 z nich stwierdzono malarię przebytą w przeszłości, podczas pracy w strefie endemicznej (84,0%). Pacjenci ci zgłaszali mało charakterystyczne dolegliwości



kliniczne, takie jak gorączka lub stany podgorączkowe w wywiadzie, okresowe bóle brzucha, biegunka, zmiany skórne, kaszel i osłabienie ogólne. U 34 spośród 50 osób z grupy kontrolnej wykryto inne pasożytozy tropikalne i choroby infekcyjne (68,0%): pełzakowicę jelitową (n=18), filariozy układu limfatycznego (n=5), schistosomozę *S. mansoni* (n=3) lub *S. intercalatum* (n=1), leiszmaniozę skórą (n=1), toksokarozę (n=1), nużycę (demodekozę) skóry i rzęs (n=1), ukąszenie przez pająka jadowitego (n=1), biegunkę zakaźną (n=2), gorączkę o charakterze infekcyjnym (n=2), trąd (n=1), pneumocystozę i zakażenie wirusem HIV (n=1). U 27 misjonarzy (54,0%) stwierdzono obecność więcej niż jednej choroby egzotycznej (Ryc. 29).



Ryc. 29. Egzotyczne choroby pasożytnicze i infekcyjne rozpoznane u pacjentów z grupy kontrolnej (n=50).

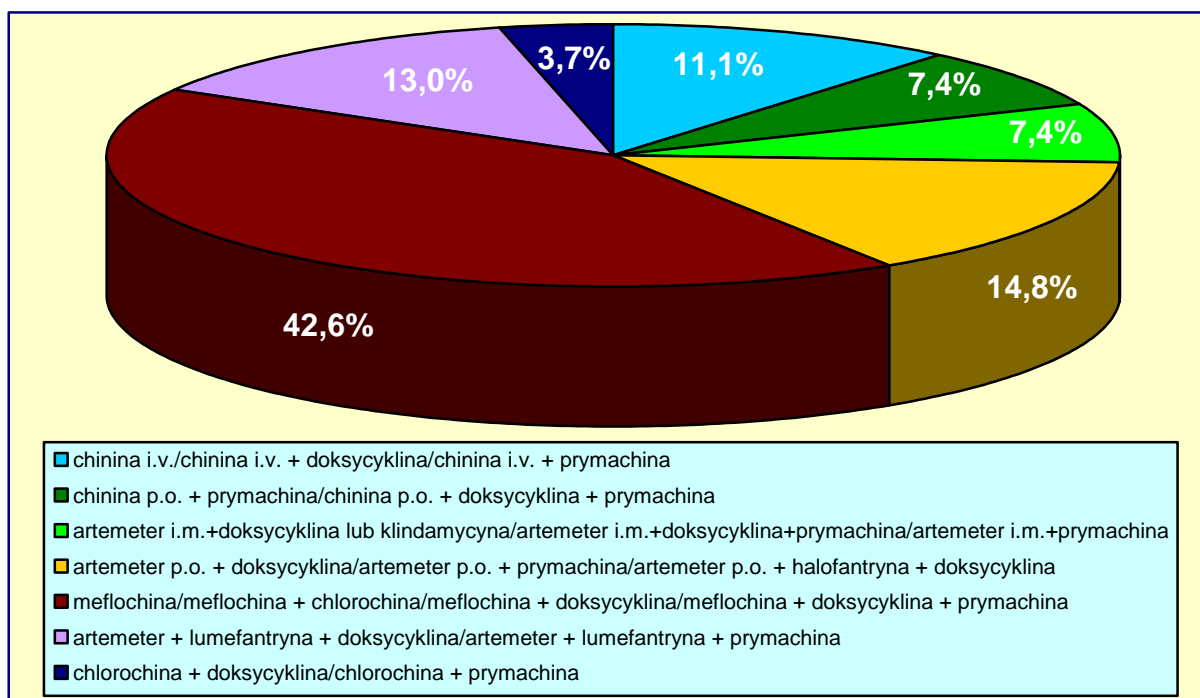
#### 4.4. Wyniki leczenia pacjentów z malarią

Pacjenci z rozpoznaniem zarażeniem *Plasmodium* spp. wymagali wdrożenia intensywnego leczenia przeciwpasożytniczego oraz objawowego, w zależności od stwierdzanych cech niewydolności wielonarządowej i zaburzeń w zakresie parametrów równowagi wodno-elektrolitowej i kwasowo-zasadowej, układu krzepnięcia i fibrynolizy, morfologii krwi obwodowej oraz markerów czynności wątroby i nerek (płyny infuzyjne, przetoczenia krwi i preparatów krwiopochodnych, leki przeciwgorączkowe, przeciwzapalne, moczopędne, hemostatyczne,

przeciwwkrwotoczne, hepatoprotekcyjne oraz probiotyki). U jednej pacjentki z malarią mózgową i krytyczną parazytamią we krwi obwodowej wynoszącą 18,6%, przeprowadzono transfuzję wymienną krwi z pozytywnym efektem terapeutycznym. Zgodnie z aktualnymi wytycznymi Światowej Organizacji Zdrowia, w zakresie ograniczania szybko rozprzestrzeniającej się lekooporności na stosowane leki przeciwmalaryczne, większość hospitalizowanych przypadków zimnicy (n=49) otrzymywało leczenie skojarzone z zastosowaniem dwóch lub nawet trzech preparatów pierwotniakobójczych (90,7%). Dobór terapii był ustalany indywidualnie dla każdego pacjenta, w zależności od stanu klinicznego chorego, długości utrzymywania się objawów chorobowych i czasu zgłoszenia się do Kliniki, gatunku (lub gatunków) zarodźca zimnicy, intensywności inwazji oraz obszaru geograficznego, w którym doszło do zarażenia *Plasmodium* spp. Chorzy z powikłaną postacią kliniczną zimnicy i cechami niewydolności wielonarządowej otrzymywali parenteralne preparaty chininy lub pochodnych artemizyny. U pacjentów zarażonych *P. vivax* lub *P. ovale* nie powracających bezpośrednio do rejonów endemicznego występowania malarii, albo w inwazjach mieszanych wywoływanych przez te gatunki zarodźca zimnicy, oprócz leczenia ostrego ataku malarii, podawano uzupełniająco prymachinę dla całkowitej eradykacji wewnątrzwątrobowych hypnozoitów, w celu zapobiegania odległym nawrotom choroby.

Do leków przeciwmalarycznych i ich kombinacji, stosowanych u pacjentów hospitalizowanych lub konsultowanych w Klinice należały: (i) chinina parenteralna, podawana w monoterapii (n=3) lub w połączeniu z dożylną doksycykliną (n=2) lub prymachiną (n=1), (ii) chinina doustna w skojarzeniu z prymachiną (n=3) lub doksycykliną i prymachiną (n=1), (iii) artemeter podawany domięśniowo w połączeniu z doksycykliną (n=1), klindamycyną (n=1), prymachiną (n=1) lub doksycykliną i prymachiną (n=1), (iv) artemeter w formie doustnej w skojarzeniu z doksycykliną (n=4), prymachiną (n=3) lub halofantryną i doksycykliną (n=1), (v) meflochina w monoterapii (n=2) lub w połączeniu z doksycykliną (n=16), chlorochiną (n=1) lub doksycykliną i prymachiną (n=4), (vi) artemeter z lumefantryną i doksycykliną (n=6) lub artemeter z lumefantryną i prymachiną (n=1), a także (vii) chlorochina podawana w połączeniu z doksycykliną (n=1) lub prymachiną (n=1). Najczęściej stosowane formy skojarzonego leczenia przeciwmalarycznego zawierały w swoim składzie meflochinę (42,6%) lub artemeter (35,2%). Zestawienie sposobów indywidualnie

dobranej terapii przeciw pasożytniczej u badanych pacjentów z malarią przedstawiono na Rycinie 30.



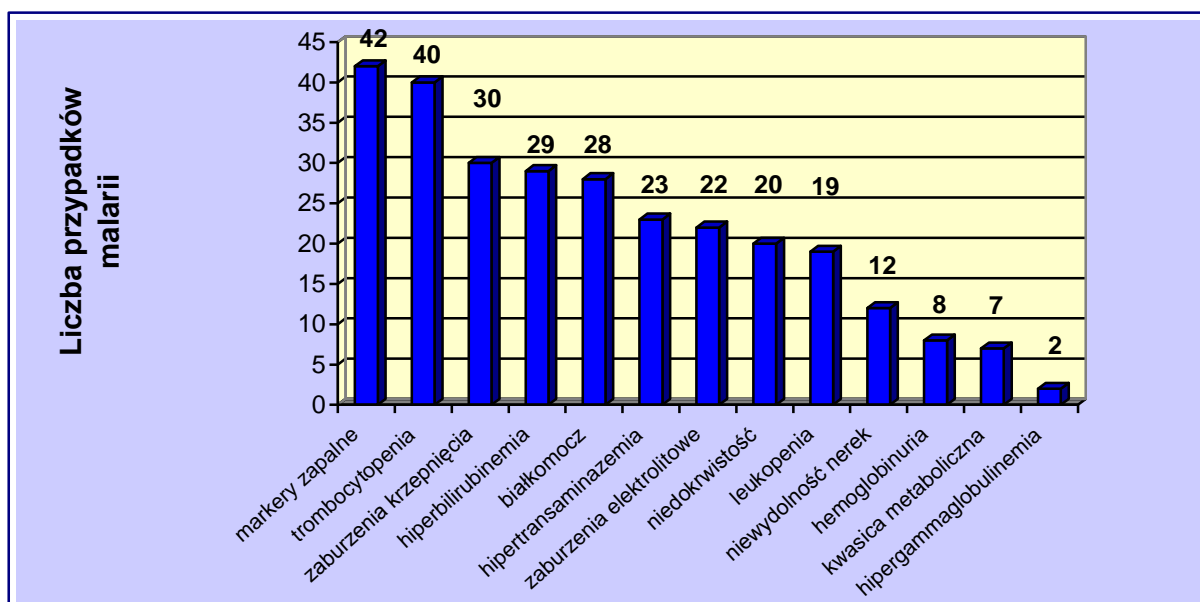
Ryc. 30. Rodzaj swoistej terapii przeciw pasożytniczej stosowanej w przypadkach malarii rozpoznanych w Klinice (n=54).

## 4.5. Analiza parametrów laboratoryjnych

### 4.5.1. Ocena podstawowych parametrów morfologiczno-biochemicznych krwi obwodowej i moczu u badanych pacjentów

Wśród 54 przypadków ostrej malarii, hospitalizowanych lub konsultowanych w Klinice, do najczęściej występujących i najbardziej charakterystycznych zaburzeń laboratoryjnych należały: wysokie poziomy markerów zapalnych (odczyn Biernackiego, białko C-reaktywne, prokalcytonina) (77,8%), trombocytopenia (74,1%), hiperbilirubinemia (53,7%), zmiany w układzie krzepnięcia (55,5%) w postaci wysokiego stężenia D-dimerów oraz przedłużonych czasów krwawienia i krzepnięcia (48,1%) oraz cechy pełnoobjawowego zespołu wykrzepiania śródnaczyniowego z niskim stężeniem fibrynogenu oraz antytrombiny III (7,4%), hipertransaminazemia (42,6%), zaburzenia elektrolitowe (hiponatremia i hipokaliemia) (40,7%), podwyższone stężenie mocznika i kreatyniny (22,2%), niedokrwistość (37,0%),

leukopenia (35,2%), kwasica metaboliczna z wysokim stężeniem kwasu mlekowego w surowicy oraz niskim poziomem wodorowęglanów we krwi włośniczkowej (13,0%), hipergammaglobulinemia (3,7%), leukocytoza (1,8%), a także białkomocz (51,8%) i hemoglobinuria (14,8%) (Ryc. 31).



**Ryc. 31. Odchylenia laboratoryjne u pacjentów z malarią rozpoznaną w Klinice (n=54).**

Spośród niekorzystnych wykładników laboratoryjnych powiklanej malarii o niekorzystnym znaczeniu prognostycznym wg kryteriów Światowej Organizacji Zdrowia (patrz Tabela III, podrozdział 3.4.) u badanych pacjentów najczęściej obserwowano: wysokie poziomy mocznika i kreatyniny (n=12), wysoką aktywność aminotransferaz (> 3-krotną) (n=2), cechy kwasicy metabolicznej (n=7), parametry zespołu wykrzepiania śródnaczyniowego (n=4), głęboką niedokrwistość (n=1) i leukocytozę (n=1). Trombocytopenia, wysokie stężenia markerów zapalnych oraz hiperbilirubinemia, chociaż występowały u większości badanych pacjentów z malarią, nie mogły być wykorzystane w ocenie stanu klinicznego, gdyż obserwowano je często również w niepowikłanych przypadkach zimnicy.

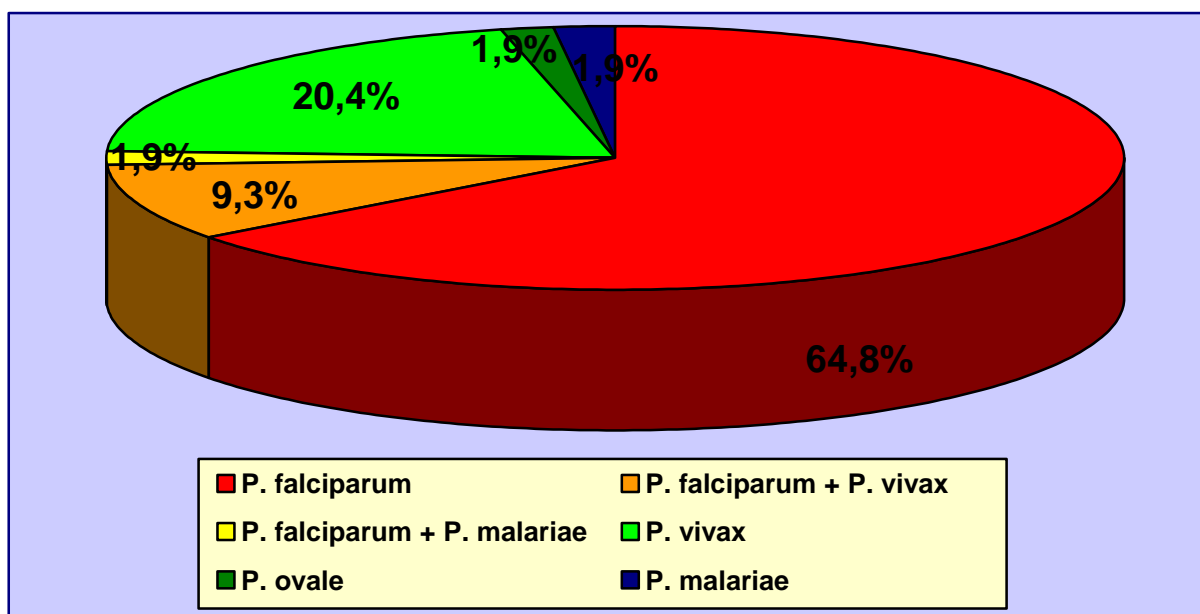
#### **4.5.2. Analiza mikroskopowa preparatów grubej kropli i cienkiego rozmazu krwi obwodowej w kierunku zarodźców malarii u badanych pacjentów**

W badanej grupie 54 pacjentów z ostrym epizodem malarii, na podstawie dodatknych wyników preparatów grubej kropli i cienkiego rozmazu krwi obwodowej, potwierdzono zarażenie *Plasmodium* spp. u wszystkich pacjentów. Gatunkiem zarodźca zimnicy, który wywołał większość zarażeń był zarodziec sierpowaty *P. falciparum*, który u 35 osób był jedynym rozpoznanym gatunkiem (64,8%). Inwazja *P. falciparum* została również stwierdzona we wszystkich trzech przypadkach zimnicy hospitalizowanych w oddziałach chorób zakaźnych południowej Polski i konsultowanych w Klinice. Drugą pod względem częstości występowania była inwazja *P. vivax*, stwierdzona w 11 przypadkach malarii (20,4%). Spośród dwóch kolejnych pacjentów (3,7%), jedna osoba chorowała na malarię wywołaną przez *P. ovale*, a kolejna była zarażona rzadkim gatunkiem *P. malariae*. W badaniach grubej kropli i cienkiego rozmazu krwi obwodowej stwierdzano także inwazje mieszane, które stanowiły 11,1% wszystkich rozpoznań mikroskopowych (n=6). Pięciu pacjentów chorowało na malarię wywołaną przez *P. falciparum* i *P. vivax* (9,3%), a u jednej osoby zarażeniu *P. falciparum* towarzyszyło *P. malariae* (1,85%). Łącznie, inwazje wywoływane przez *P. falciparum* lub zarażenia mieszane, w których jednym z wykrywanych gatunków był zarodziec sierpowaty, stanowiły 75,9% badanych przypadków malarii (n=41). W analizowanych w Klinice przypadkach malarii nie wykrywano zarażeń mieszanych wywoływanych przez więcej niż dwa gatunki zarodźca zimnicy.

U trzech pacjentów hospitalizowanych w Klinice z powodu inwazji *P. vivax* pojawiły się nawroty zarażenia w ciągu kilku miesięcy od wystąpienia pierwszego epizodu zimnicy (5,6%): u dwóch osób - dwukrotnie i u jednego pacjenta - jednokrotnie. Z kolei u innego pacjenta hospitalizowanego z powodu malarii *P. falciparum*, po miesiącu od zakończenia celowanego leczenia ostrego ataku malarii ujawniła się współistniejąca inwazja *P. vivax* i jej reaktywacja po kolejnych 3 tygodniach (patrz podrozdział 3.2.1.). Pacjent ten nie zastosował się do leczenia prymachiną w celu eradykacji wewnątrzwątrobowych hypnozoitów *P. vivax* z powodu kolejnego wyjazdu do krajów tropikalnych w celach służbowych. Podczas

prowadzenia badań objętych tematyką rozprawy doktorskiej, w Klinice nie obserwowano reaktywacji zarażenia *P. ovale* ani *P. malariae*.

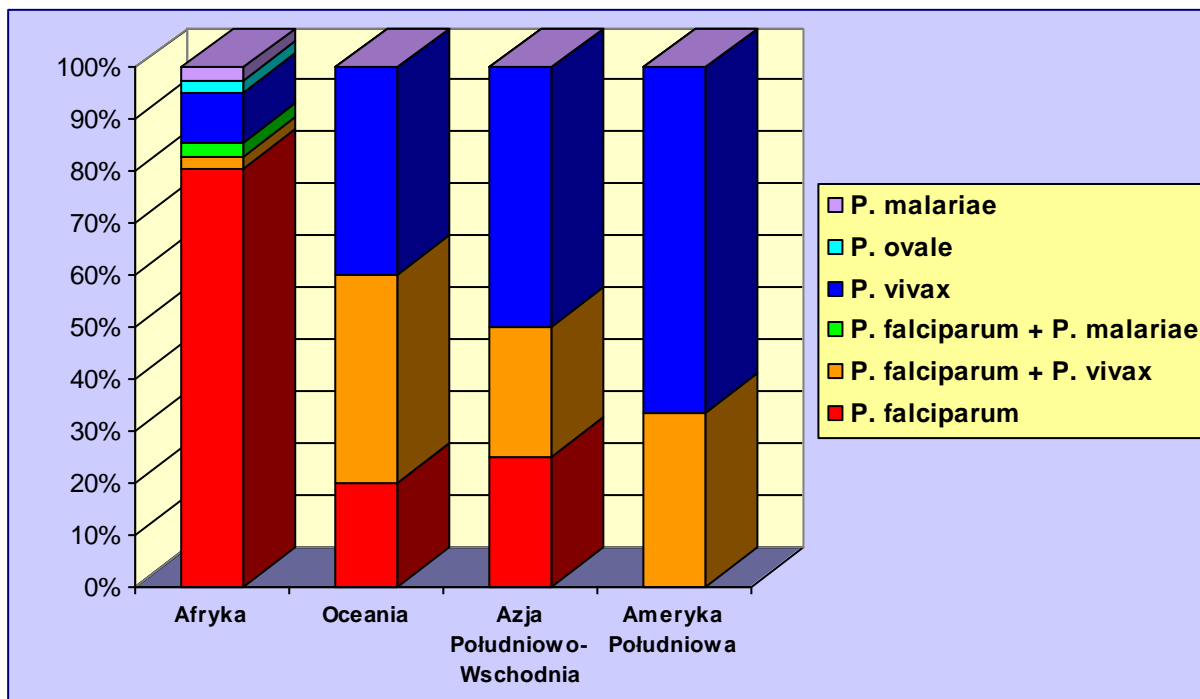
Częstość występowania poszczególnych gatunków zarodźca zimnicy, ustalonych na podstawie mikroskopowego badania parazytologicznego krwi obwodowej u badanych pacjentów zestawiono na Rycinie 32.



Ryc. 32. Częstość występowania poszczególnych gatunków *Plasmodium* spp. we krwi obwodowej badanych pacjentów z malarią, hospitalizowanych lub konsultowanych w Klinice (n=54).

Inwazje wywołane przez *P. falciparum* i zarażenia mieszane dotyczyły przede wszystkim pacjentów, którzy przebywali w Afryce (85,4%), a spośród krajów afrykańskich ten gatunek zarodźca zimnicy najczęściej importowano z Ghany, Kamerunu i Nigerii. Pacjenci zarażeni zarodźcem sierpowatym, którzy importowali zimnicę z Oceanii, Azji Południowo-Wschodniej i Ameryki Południowej stanowili kolejno 7,3%, 4,9% i 2,4% badanych. Zarażenia wywołane wyłącznie przez *P. vivax* były przeważnie nabywane przez osoby podróżujące poza subkontynentem afrykańskim: w krajach Azji i wyspach Dalekiego Pacyfiku (71,4%). Prawie połowa pacjentów z zimnicą wywołaną przez *P. vivax* powracała z Indonezji (42,9%). Kraje Afryki Subsaharyjskiej i wyspy Oceanii odwiedziła taka sama liczba pacjentów zarażonych zarodźcem ruchliwym (odpowiednio po 28,6%). W przypadku inwazji *P. ovale* oraz *P. malariae*, zimnicę wywołaną tymi gatunkami zarodźca zawleczono

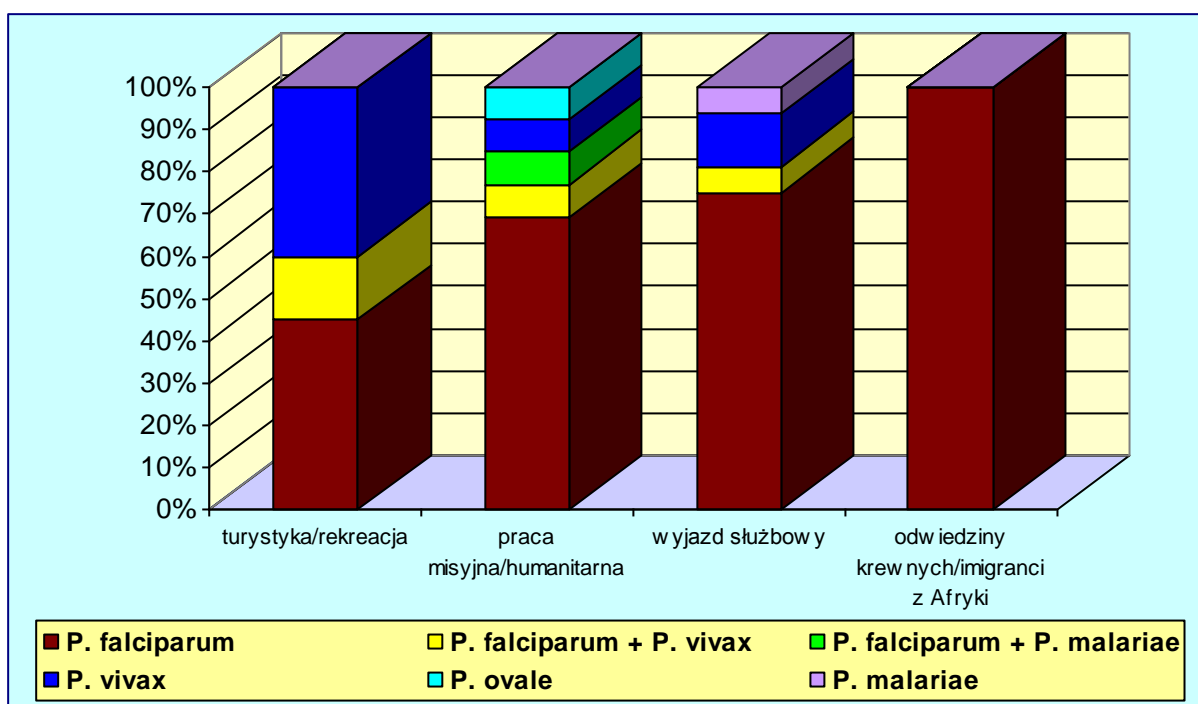
wyłącznie z Afryki (Zambia i Gabon). Rozkład poszczególnych gatunków *Plasmodium* spp. importowanych z różnych rejonów geograficznych świata przedstawiono na Rycinie 33.



Ryc. 33. Zależność pomiędzy rozpoznaniem gatunku zarodźca zimnicy, a kierunkiem podróży pacjentów z malarią, hospitalizowanych lub konsultowanych w Klinice (n=54).

Zarodziec sierpowaty był odpowiedzialny za wszystkie przypadki malarii nabywanej przez imigrantów z krajów strefy tropikalnej, przebywających okresowo w Polsce w celach edukacyjnych lub zarobkowych i odwiedzających członków rodzin w ojczyźnie oraz u osób mieszkających na stałe w Afryce i podróżujących do Polski w celach służbowych (100%). Gatunek *P. falciparum* i inwazje mieszane były obserwowane zdecydowanie częściej podczas wyjazdów do pracy w ośrodkach misyjnych oraz innych podróży o charakterze zawodowym (82,8%), niż w czasie wyjazdów turystyczno-rekreacyjnych do obszarów klimatu międzyzwrotnikowego i subtropikalnego (60%) (test  $\chi^2$ ,  $P = 0,0003$ ). *P. falciparum* okazał się być szczególnie częstym zagrożeniem dla misjonarzy długotrwale przebywających w tropiku w skromnych warunkach klimatyczno-sanitarnych (84,6%) niż dla turystów wyjeżdżających w celach wypoczynkowych (test  $\chi^2$ ,  $P = 0,03$ ). Natomiast największą

liczbę inwazji mieszanych wywołanych przez *P. falciparum* i *P. vivax* notowano podczas podróży turystycznych (60%). Podobnie, izolowane zarażenia *P. vivax* były wykrywane znacznie częściej wśród turystów (40%), niż u misjonarzy (7,7%) i innych osób wyjeżdżających do tropiku w celach zawodowych (12,5%) (test  $\chi^2$ ,  $P < 0,000001$ ) (Ryc. 34).

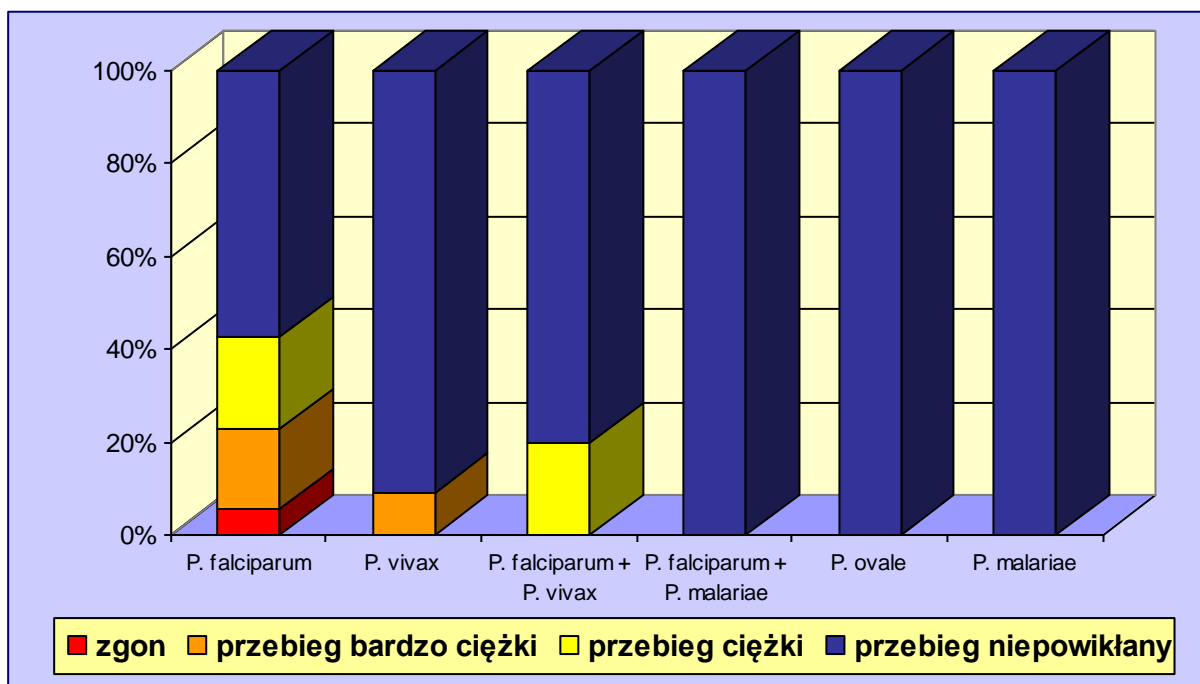


**Ryc. 34. Zależność pomiędzy celem podróży do krajów strefy międzyzwrotnikowej i subtropikalnej a gatunkiem zarodźca zimnicy rozpoznany w Klinice (n=54).**

Na podstawie analizy danych pacjentów z zimnicą wykazano, że istniała bezpośrednia zależność pomiędzy przebiegiem klinicznym malarii, a gatunkiem zarodźca, który był odpowiedzialny za wywołanie choroby. Zarodziec sierpowaty i zarażenia mieszane były odpowiedzialne za 100% przypadków śmiertelnych oraz o charakterze ciężkim, a także 85,7% przypadków o przebiegu bardzo ciężkim. *P. vivax* wywołał tylko jeden przypadek zimnicy o przebiegu bardzo ciężkim z objawami niewydolności oddechowej u chorego powracającego z Papui-Nowej Gwinei, obciążonego wrodzoną niedokrwistością mikrocytową i niedoborem dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej. U większości pacjentów z izolowaną inwazją *P. vivax* obserwowano klasyczny, niepowikłany obraz kliniczny malarii (85,7%). Ciężkie postaci powikłanej zimnicy były tylko następstwem zarażenia *P. falciparum*

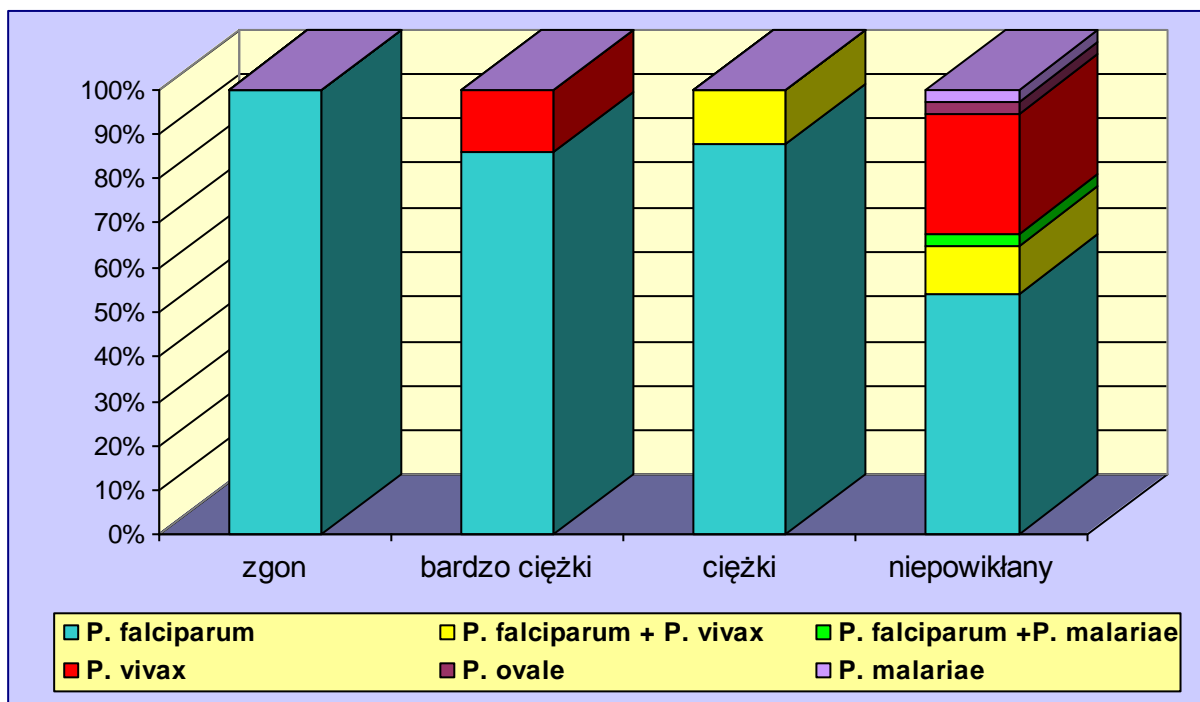


lub inwazji mieszanych. Pozostałe gatunki *P. ovale* i *P. malariae* były odpowiedzialne wyłącznie za niepowikłane przypadki malarii (Ryc. 35 i 36).

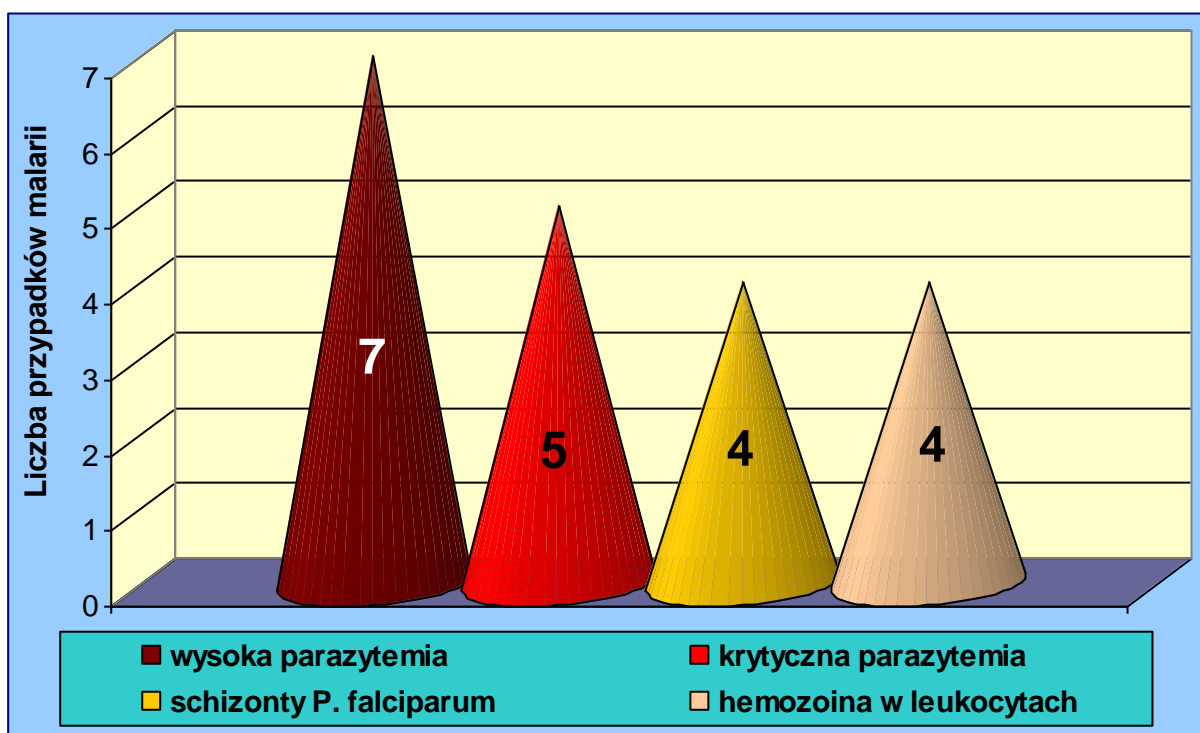


**Ryc. 35. Zależność pomiędzy rozpoznanym gatunkiem *Plasmodium* spp. a charakterem przebiegu klinicznego malarii u pacjentów hospitalizowanych lub konsultowanych w Klinice (n=54).**

Szczegółowa analiza mikroskopowa preparatów grubej kropli i cienkiego rozmazu krwi obwodowej u pacjentów z malarią, umożliwiła ujawnienie obecności parazytologicznych wykładników o istotnym znaczeniu rokowniczym (patrz Rycina 12 A i B, podrozdział 3.5.1.). Niekorzystne markery prognostyczne zaobserwowano w rozmazach krwi obwodowej w 13 przypadkach malarii (24,1%). Najczęściej wykrywanym wykładnikiem parazytologicznym powikłanej zimnicy była wysoka intensywność inwazji, która została potwierdzona u 7 pacjentów (13,0%). U kolejnych 5 chorych odsetek zarażonych erytrocytów osiągnął poziom krytyczny przekraczający 10% zarażonych krwinek czerwonych (9,3%), a najwyższy, notowany poziom parazytemii w postaci agonalnej malarii, importowanej z Nigerii wynosił aż 26,5%. Dodatkowo, obecność schizontów *P. falciparum* w erytrocytach krwi obwodowej stwierdzono u 4 chorych z ciężkim i bardzo ciężkim przebiegiem klinicznym malarii (7,4%), a kryształki hemozoiny wykazano w granulocytach obojętnochłonnych u 4 pacjentów (7,4%) (Ryc. 37).



Ryc. 36. Zależność pomiędzy przebiegiem klinicznym malarii a rozpoznanym gatunkiem *Plasmodium* spp. u pacjentów hospitalizowanych lub konsultowanych w Klinice (n=54).



Ryc. 37. Częstość występowania niekorzystnych wykładników parazytologicznych powikłanej malarii u pacjentów hospitalizowanych lub konsultowanych w Klinice (n=54).

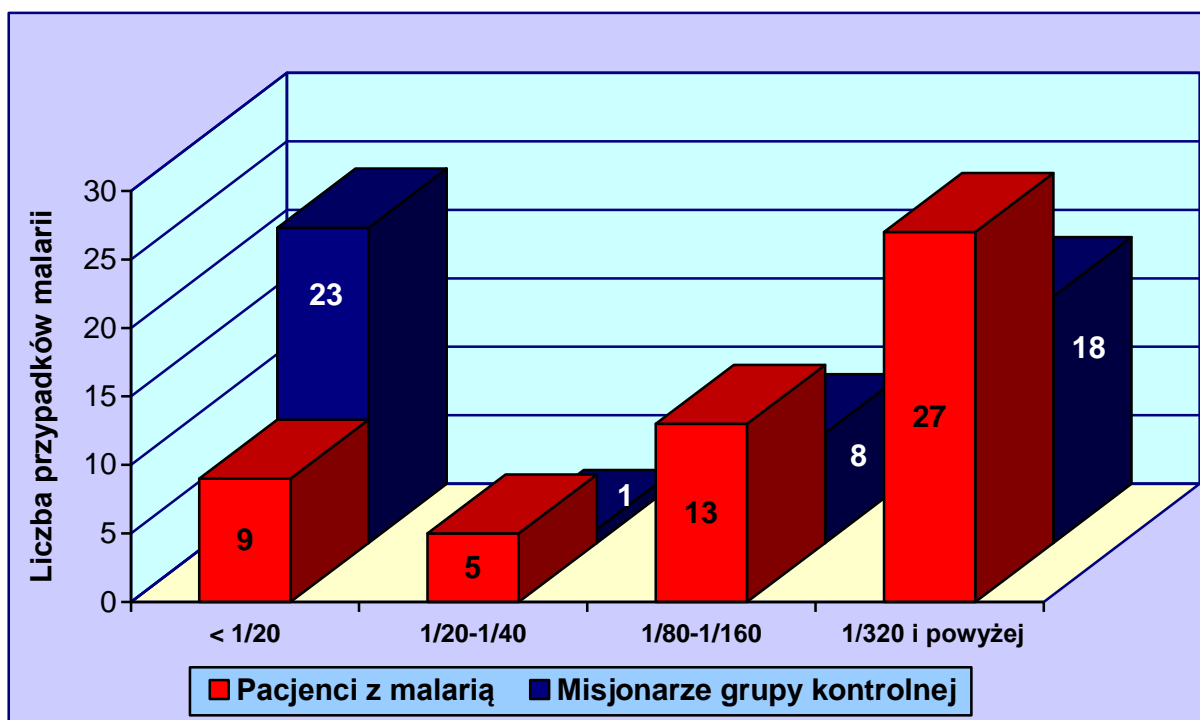
W 4 przypadkach ostrej malarii zaobserwowano obecność więcej niż jednego niekorzystnego rokowniczo markera parazytologicznego powikłanej zimnicy (7,4%): u 2 osób była to odpowiednio krytyczna lub wysoka parazytemia wraz z obecnością schizontów *P. falciparum* i złogów hemozoiny w granulocytach, u jednego pacjenta - krytyczna parazytemia oraz hemozoina w leukocytach, a w ostatnim przypadku - zarówno wysoka parazytemia, jak i obecność schizontów *P. falciparum* w erytrocytach krwi obwodowej. Najwyższa intensywność inwazji *P. falciparum* obserwowana wśród pacjentów leczonych w Klinice z pozytywnym efektem terapeutycznym osiągnęła 18,6%. W dwóch przypadkach zgonów rejestrowanych w oddziałach chorób zakaźnych, w przesłanych do oceny parazytologicznej rozmazach krwi obwodowej, potwierdzono obecność skrajnie wysokiej parazytemii (odpowiednio 9,9% oraz 26,5%) oraz złogów hemozoiny w granulocytach obojętnochłonnych u jednego z pacjentów.

#### **4.5.3. Wyniki występowania swoistych przeciwciał w kierunku *Plasmodium spp.* we krwi obwodowej badanych pacjentów**

W dniu przyjęcia do szpitala, spośród 54 przypadków malarii, dodatni poziom całkowitej puli swoistych przeciwciał IgM-IgG w kierunku *Plasmodium spp.* posiadało 34 pacjentów (63,0%), u 5 osób wynik testu był wątpliwy (9,2%), natomiast u 15 chorych nie stwierdzono przeciwciał w kierunku malarii w surowicy krwi obwodowej (27,8%). Wśród 34 seropozytywnych pacjentów, umiarkowanie dodatni poziom przeciwciał (1/80 – 1/160) wykazywało 10 osób (29,4%), natomiast w 24 przypadkach (70,6%) poziom przeciwciał był wysoki ( $\geq 1/320$ ). Podczas hospitalizacji w Klinice, u 6 kolejnych pacjentów zaobserwowano serokonwersję swoistych przeciwciał w kierunku *Plasmodium spp.* (11,1%). Łącznie, obecność przeciwciał IgM-IgG w kierunku zarodźca zimnicy potwierdzono w 40 przypadkach malarii (74,1%). Dodatni poziom swoistych przeciwciał w kierunku *Plasmodium spp.* obserwowano znacznie częściej u pacjentów z zarażeniem *P. falciparum* i w inwazjach mieszanych, niż w przypadku malarii wywoływanej przez gatunki inne niż *P. falciparum* (test  $\chi^2$ ,  $P < 0,000001$ ). Pacjenci, którzy wielokrotnie podróżowali do strefy endemicznego występowania malarii lub pochodzili z krajów afrykańskich (imigranci), znacznie częściej wykazywali dodatni poziom przeciwciał we krwi obwodowej niż osoby, które powróciły z pierwszej wyprawy tropikalnej (test  $\chi^2$ ,  $P = 0,006$ ).

Wśród 50 misjonarzy z grupy kontrolnej, 26 pacjentów posiadało obecność swoistych przeciwciał IgG w kierunku *Plasmodium* spp. (52,0%), świadcząca o uzyskaniu częściowej odporności przeciwmalarycznej u tych osób. U jednego misjonarza powracającego z Togo, stwierdzono wątpliwy wynik testu (2,0%), natomiast u 23 osób nie wykazano obecności przeciwciał we krwi obwodowej (46,0%). Spośród 26 seropozytywnych misjonarzy, 18 badanych posiadało wysoko dodatni poziom swoistych przeciwciał w kierunku zarodźca zimnicy (69,2%), natomiast u 8 pozostałych pacjentów wartości przeciwciał były umiarkowanie podwyższone (30,8%). Pacjenci z potwierdzoną malarią posiadali znacznie częściej dodatni poziom swoistych przeciwciał w kierunku zarodźca zimnicy niż misjonarze z grupy kontrolnej (test  $\chi^2$ ,  $P = 0,000002$ ).

Profil immunologiczny swoistych przeciwciał IgM-IgG w kierunku *Plasmodium* spp. u chorych z malarią oraz w grupie kontrolnej został przedstawiony na Rycinie 38.



Ryc. 38. Porównanie wyników występowania swoistych przeciwciał w kierunku *Plasmodium* spp. u pacjentów z malarią (n=54) oraz w grupie kontrolnej (n=50).

#### **4.5.4. Wyniki szybkiego testu immunochromatograficznego w kierunku antygenów *Plasmodium* spp. u badanych pacjentów**

Spośród 54 przypadków malarii, rozpoznanych na podstawie obecności form rozwojowych *Plasmodium* spp. w erytrocytach krwi obwodowej, dodatni wynik testu immunochromatograficznego wskazujący na obecność zarówno antygeny HRP-2 *P. falciparum*, jak i dehydrogenazy mleczanowej swoistej dla rodzaju *Plasmodium* (pLDH) stwierdzono w dniu przyjęcia do szpitala u połowy badanych pacjentów (n=27).

Wśród 27 osób posiadających oba antygeny *Plasmodium* spp. we krwi obwodowej (50%), znajdowały się 24 inwazje wywołane wyłącznie przez zarodźca sierpowatego (88,9%), dwa zarażenia mieszane spowodowane przez *P. falciparum* i *P. vivax*. (7,4%) oraz jedno zachorowanie na malarię *P. vivax* (3,7%). Pacjent z zarażeniem *P. vivax* był już uprzednio hospitalizowany w Klinice z powodu zimnicy *P. falciparum* w okresie 3 tygodni poprzedzających wykonanie oznaczeń, stąd też wykrywany u niego antygen HRP-2 utrzymywał się we krwi obwodowej w związku z poprzednim epizodem zimnicy.

Dodatni wynik testu w zakresie obecności samego antygeny HRP-2 uzyskano w 10 przypadkach malarii (18,5%); u wszystkich tych osób potwierdzono zarażenie *P. falciparum* na podstawie badania mikroskopowego rozmazów krwi obwodowej. Łącznie, obecność białka bogatego w histydynę wykryto u 37 pacjentów (68,5%), co stanowiło 97,1% chorych na malarię wywołaną przez zarodźca sierpowatego, 87,8% pacjentów z zarażeniem, w którym co najmniej jednym z rozpoznanych gatunków było *P. falciparum* (*P. falciparum* i malaria mieszana) oraz tylko 33,3% osób z rozpoznaną mikroskopowo inwazją mieszaną.

Test immunochromatograficzny wykazał obecność dehydrogenazy mleczanowej *Plasmodium* spp. (pLDH), jako jedyne wykrywanego antygeny, tylko w 15 przypadkach malarii (27,8%), a wśród nich w 10 zarażeniach wywołanych jedynie przez *P. vivax* (66,6%), 3 inwazjach mieszanych *P. falciparum* i *P. vivax* (20,0%), jednym przypadku zimnicy wywołanej przez *P. falciparum* (6,7%) oraz jednym, izolowanym zarażeniem *P. malariae* (6,7%). Łącznie, nieswoista gatunkowo dehydrogenaza mleczanowa była wykrywana w 42 przypadkach zimnicy (77,8%), co stanowiło 100% pacjentów zarażonych zarodźcem ruchliwym, jak i również 100% osób z inwazją, w której jednym z rozpoznanych mikroskopowo gatunków było *P.*

*vivax* (*P. vivax* oraz inwazja mieszana *P. falciparum* i *P. vivax*), 71,4% pacjentów z izolowaną inwazją *P. falciparum* i tylko 50,0% przypadków malarii wywoływanych przez inne gatunki niż *P. falciparum* i *P. vivax* (inwazje *P. ovale* i *P. malariae*).

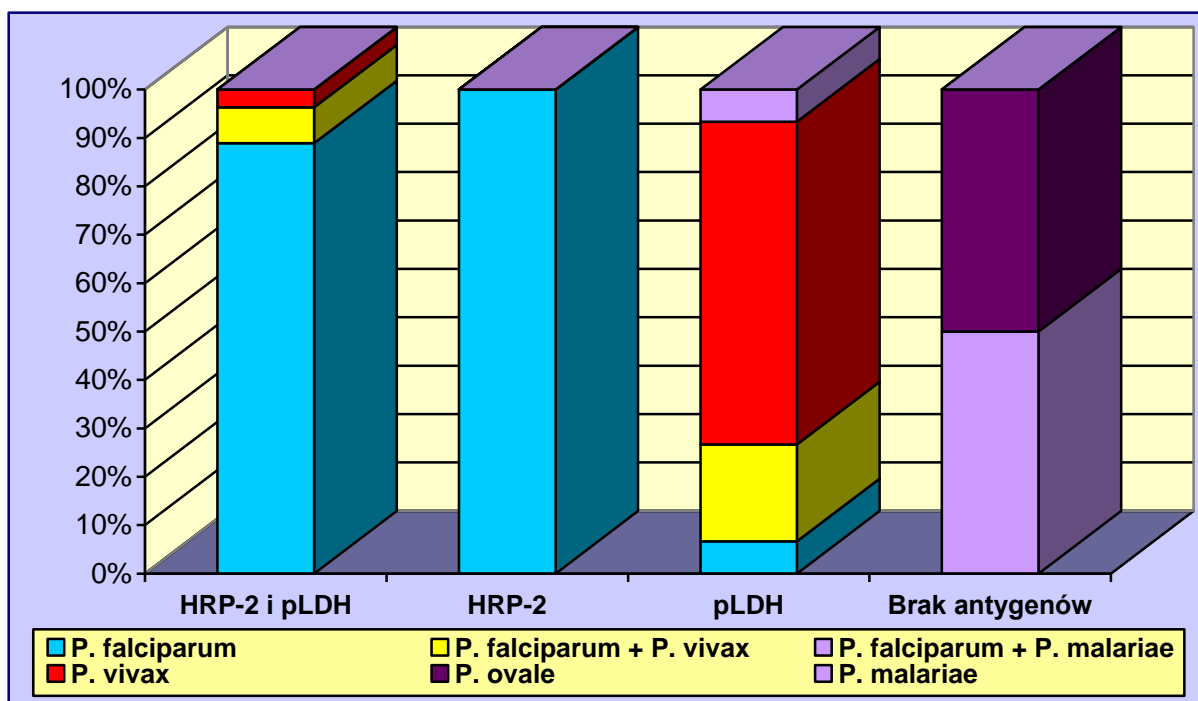
Tylko w dwóch przypadkach malarii, potwierdzonych badaniami mikroskopowymi krwi obwodowej, test immunochromatograficzny nie wykazał obecności żadnych antygenów *Plasmodium* spp. we krwi obwodowej (3,7%). Wynik fałszywie ujemny był obserwowany u pacjenta z izolowaną zimnicą *P. ovale* oraz u chorego z inwazją mieszaną wywołaną przez *P. falciparum* i *P. malariae* o bardzo niewielkiej intensywności zarażenia, rozpoznanego jedynie na podstawie analizy preparatów grubej kropli, przy ujemnych cienkich rozmazach krwi obwodowej.

Uzyskane wyniki badań wykazały, iż w porównaniu do tradycyjnej analizy mikroskopowej, czułość diagnostyczna metody w zakresie wykrywania malarii wywoływanej przez jakikolwiek gatunek *Plasmodium* sp. kształtowała się na poziomie 96,3%, natomiast okazała się ona całkowicie niewystarczająca dla wykrywania inwazji *P. ovale*. W przypadku zarażeń, w których jednym z wykrywanych gatunków był zarodek ruchliwy (*P. vivax* lub inwazja mieszana *P. falciparum* i *P. vivax*), obserwowana czułość diagnostyczna techniki immunochromatograficznej nie była zbyt wysoka i wynosiła jedynie 82,4%. Natomiast wartość predykcyjna dodatnia testu dla rozpoznawania malarii bez różnicowania gatunkowego *Plasmodium* sp. osiągała w badanym materiale klinicznym poziom 100%.

Częstość wykrywania antygenu HRP-2 *P. falciparum* oraz dehydrogenazy mleczanowej *Plasmodium* spp. i ich profil występowania w dniu przyjęcia do szpitala, w zależności od mikroskopowego rozpoznania parazytologicznego przedstawiono na Rycinie 39 i 40.

U 6 pacjentów z ostrą malarią, wyniki tradycyjnych badań mikroskopowych krwi obwodowej w kierunku obecności form rozwojowych *Plasmodium* spp. oraz wyniki testu immunochromatograficznego wykrywającego swoiste antygeny zarodźca zimnicy w dniu przyjęcia do Kliniki nie były zgodne (11,1%). Oprócz dwóch wyników całkowicie ujemnych opisanych powyżej (3,7%), u czterech pacjentów wykazano obecność wyłącznie dehydrogenazy mleczanowej swoistej dla *Plasmodium* spp. (7,4%), gdy tymczasem mikroskopowe badania parazytologiczne wskazywały na obecność malarii mieszanej wywołanej przez *P. falciparum* i *P. vivax* w trzech przypadkach (5,6%) oraz izolowanej inwazji *P. falciparum* u pozostałego pacjenta (1,8%). U jednego chorego zaobserwowano opóźnione pojawienie się antygenu

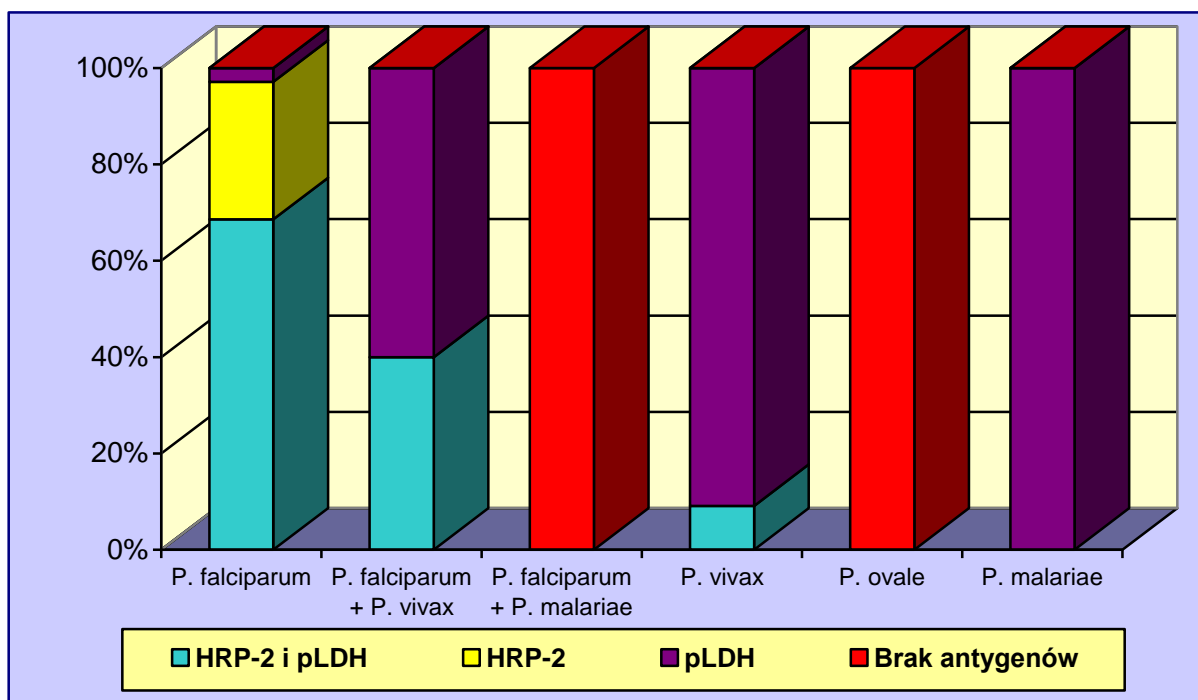
HRP-2 swoistego dla *P. falciparum* w badaniu kontrolnym, co ostatecznie potwierdziło parazytologiczne rozpoznanie malarii mieszanej wywołanej przez oba gatunki *Plasmodium*. W dwóch kolejnych przypadkach, mimo wyniku testu immunochromatograficznego wykrywającego wyłącznie dehydrogenazę, stwierdzono niezależnie obecność antygenu HRP-2 *P. falciparum* w technice immunoenzymatycznej ELISA, potwierdzając ostatecznie mikroskopowe rozpoznanie malarii mieszanej u tych chorych (patrz podrozdział 4.5.5.). Test immunochromatograficzny okazał się więc źródłem trzech wyników fałszywie ujemnych dla antygenu HRP-2 w mieszanych postaciach malarii wywołanych przez *P. falciparum* i *P. vivax* w dniu przyjęcia do Kliniki (5,6%).



Ryc. 39. Porównanie częstości wykrywania poszczególnych antygenów zarodźca zimnicy w teście immunochromatograficznym w odniesieniu do rozpoznania mikroskopowego u pacjentów z malarią hospitalizowanych i konsultowanych w Klinice (n=54). Objasnienia: HRP-2: białko bogate w histydynę swoiste dla *P. falciparum*; pLDH: nieswoista gatunkowo dehydrogenaza mleczanowa *Plasmodium* spp.

Natomiast u ostatniego pacjenta, u którego rozpoznano wstępnie inwazję wywołaną przez zarodźca sierpowatego, technika immunochromatograficzna pozwoliła na obiektywną weryfikację klasycznej diagnostyki mikroskopowej i ustalenie ostatecznego rozpoznania parazytologicznego. W tym trudnym diagnostycznie

przypadku malarii, wykluczono zarażenie *P. falciparum* i potwierdzono jednoznacznie izolowaną inwazję *P. vivax*, co zostało dodatkowo udokumentowane pojawieniem się klinicznego nawrotu zarażenia po upływie 3 miesięcy od leczenia ostrego ataku malarii oraz brakiem obecności antygenu HRP-2 w teście immunoenzymatycznym ELISA (patrz podrozdział 4.5.5.). Podsumowując, test immunochromatograficzny wykazał wyższą wartość diagnostyczną w porównaniu do tradycyjnego badania mikroskopowego krwi obwodowej u jednego, spośród 54 przypadków malarii rozpoznanych w Klinice (1,8%). Współczynnik korelacji  $r$  Spearmana uzyskanych wyników szybkiego testu immunochromatograficznego z rozpoznaniem parazytologicznymi klasycznym badaniem mikroskopowym rozmazów krwi obwodowej wynosił 0,737.

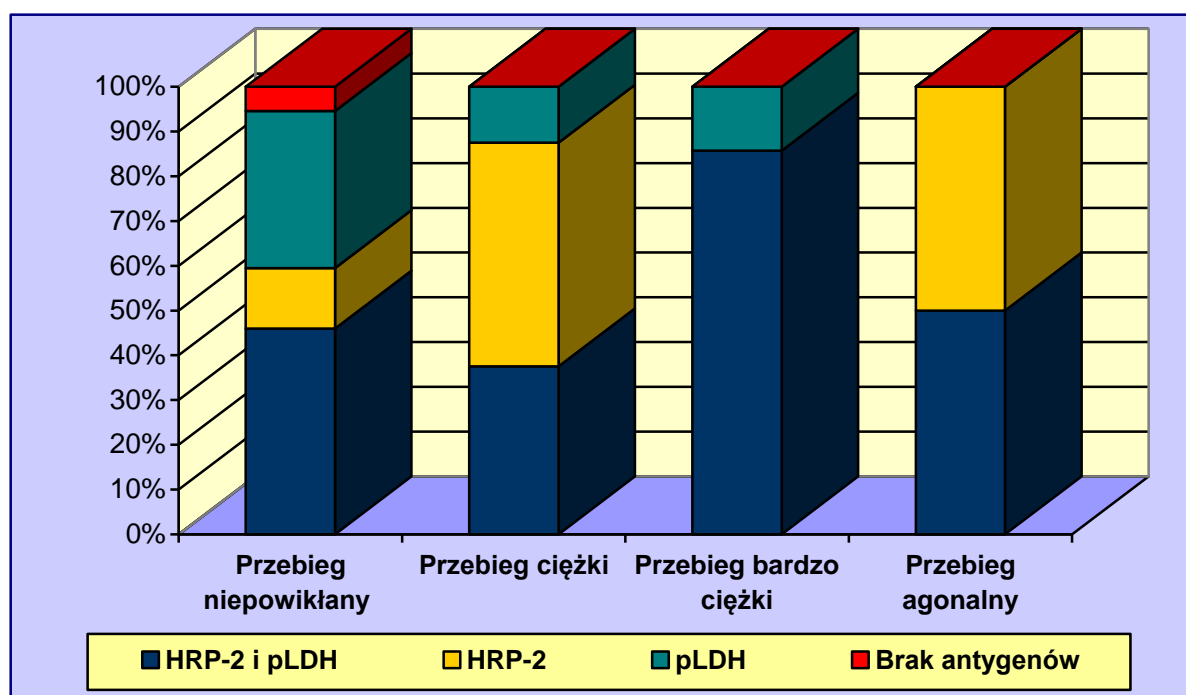


**Ryc. 40. Profil wykrywanych antygenów zarodźca zimnicy w teście immunochromatograficznym w zależności od rozpoznania mikroskopowego u pacjentów z malarią hospitalizowanych i konsultowanych w Klinice (n=54).** Objasnienia: HRP-2: białko bogate w histydynę swoiste dla *P. falciparum*; pLDH: nieswoista gatunkowo dehydrogenaza mleczanowa *Plasmodium* spp.

Po uwzględnieniu powyższych obserwacji, czułość diagnostyczna szybkiego testu immunochromatograficznego dla rozpoznawania izolowanej inwazji *P. falciparum*

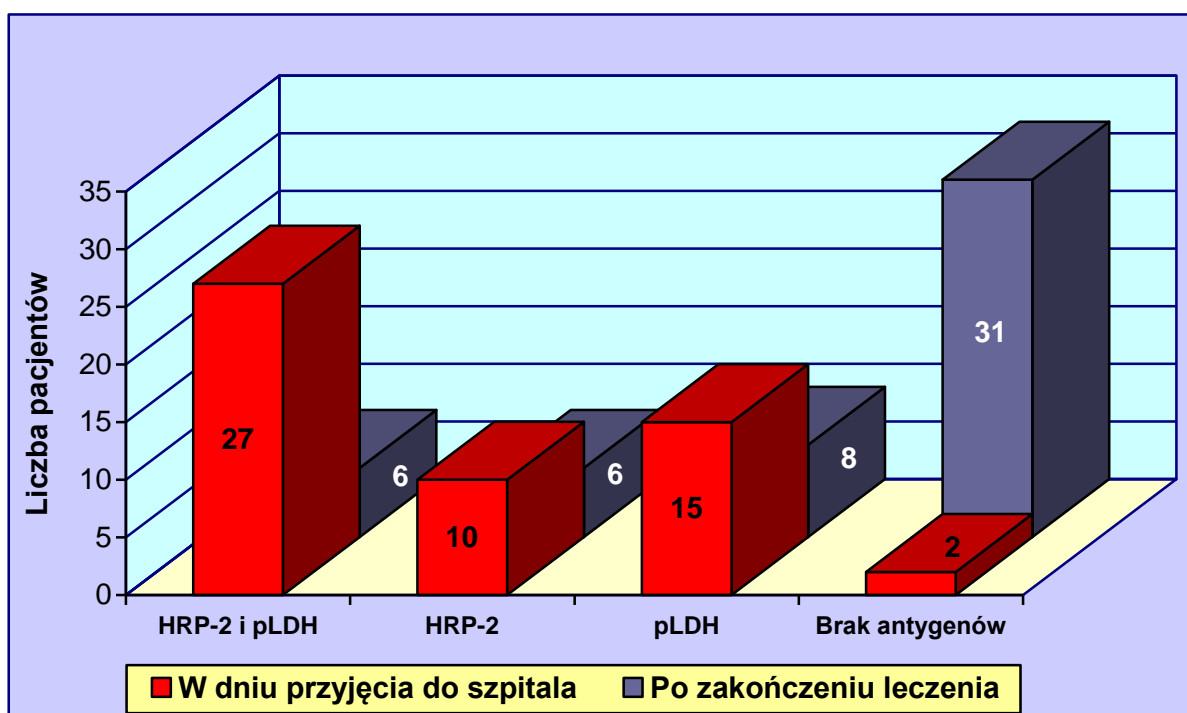


okazała się bardzo wysoka i wynosiła 100%, dla wykrywania malarii wywołanej jednocześnie przez *P. falciparum* i *P. vivax*, jak i również dla wszystkich zarażeń mieszanych kształtowała się na zdecydowanie niższym poziomie równym 60,0%, natomiast dla gatunku *P. malariae* wynosiła jedynie 50,0%. Podobnie, w analizowanym materiale klinicznym, czułość diagnostyczna zastosowanej techniki immunochromatograficznej dla wykrywania inwazji wywołanych wyłącznie przez *P. vivax* osiągnęła wysoką wartość równą 100%, natomiast dla różnicowania zarażeń innych niż *P. falciparum* lub *P. falciparum* w połączeniu z *P. vivax* była ona zdecydowanie niższa i wynosiła tylko 86,7%. Z kolei, wartość predykcyjna dodatnia metody immunochromatograficznej dla rozpoznawania izolowanych inwazji wywołanych przez *P. vivax* lub *P. falciparum* osiągnęła 100%, natomiast dla zarażeń mieszanych *P. falciparum* i *P. vivax* kształtowała się na niższym poziomie wynoszącym 83,3%.



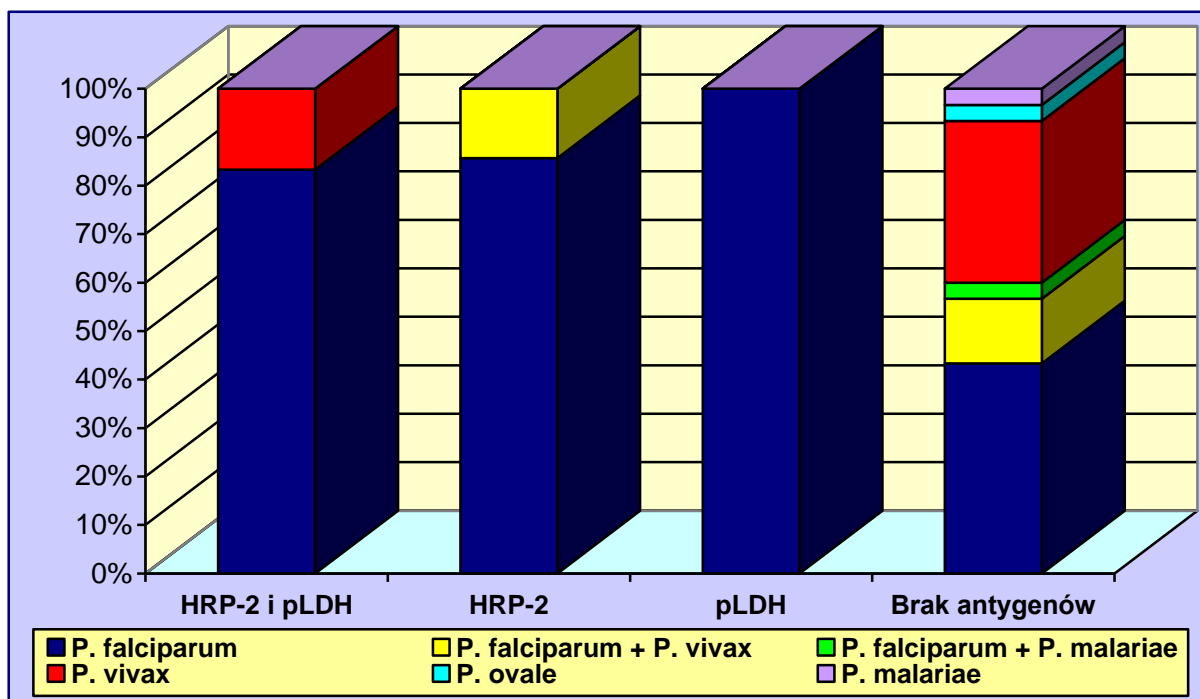
Ryc. 41. Rozkład swoistych antygenów zarodźca zimnicy we krwi obwodowej w zależności od przebiegu klinicznego malarii u pacjentów hospitalizowanych lub konsultowanych w Klinice (n=54). Objasnienia: HRP-2: białko bogate w histydynę swoiste dla *P. falciparum*; pLDH: nieswoista gatunkowo dehydrogenaza mleczanowa *Plasmodium* spp.

Profil wykrywanych antygenów zarodźca zimnicy był zróżnicowany w zależności od charakteru przebiegu klinicznego choroby. Białko bogate w histydynę było wykrywane u większości pacjentów z malarią o przebiegu ciężkim oraz bardzo ciężkim, odpowiednio w 87,5% oraz 85,7% przypadków, a odsetek osób z izolowaną obecnością dehydrogenazy mleczanowej wynosił u tych chorych jedynie 12,5% oraz 14,3%. U dwóch pacjentów z agonalnym przebiegiem klinicznym zimnicy stwierdzono obecność wyłącznie antygeny HRP-2 *P. falciparum* (100%). Różnica w częstości występowania swoistego antygeny HRP-2 w przypadkach malarii o przebiegu agonalnym oraz ciężkim i bardzo ciężkim okazała się statystycznie istotna (test  $\chi^2$ ,  $P = 0,0008$ ). U pacjentów z malarią niepowikłaną, białko bogate w histydynę wykrywano znacznie rzadziej (59,4%), niż w pozostałych grupach pacjentów zarażonych *Plasmodium* spp. (test  $\chi^2$ ,  $P < 0,000001$ ). Częstość wykrywania swoistych antygenów zarodźca zimnicy we krwi obwodowej, w zależności od przebiegu klinicznego malarii przedstawiono na Rycinie 41.



Ryc. 42. Częstość wykrywania poszczególnych antygenów zarodźca zimnicy we krwi obwodowej u pacjentów z malarią przed i po ukończeniu swoistego leczenia.

Objaśnienia: HRP-2: białko bogate w histydynę swoiste dla *P. falciparum*; pLDH: nieswoista gatunkowo dehydrogenaza mleczanowa *Plasmodium* spp.



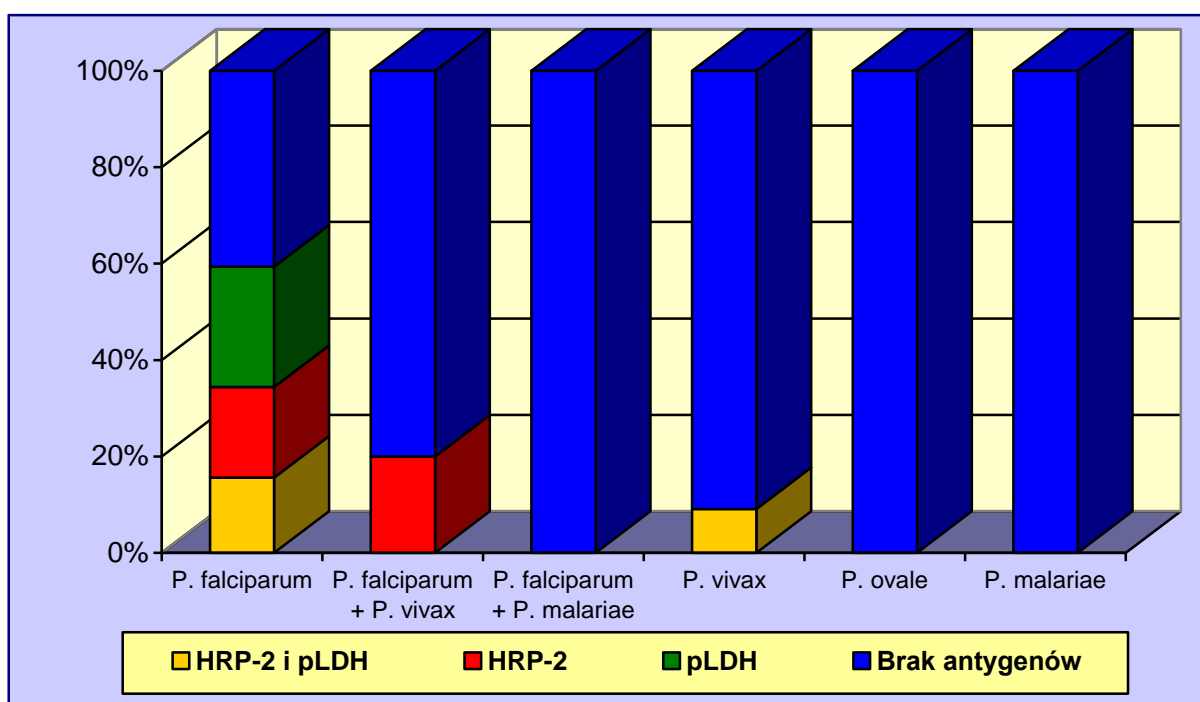
Ryc. 43. Porównanie częstości wykrywania poszczególnych antygenów zarodźca zimnicy w teście immunochromatograficznym po zakończeniu leczenia, w odniesieniu do rozpoznania mikroskopowego u pacjentów z malarią hospitalizowanych w Klinice (n=51). Objasnienia: HRP-2: białko bogate w histydynę swoiste dla *P. falciparum*; pLDH: nieswoista gatunkowo dehydrogenaza mleczanowa *Plasmodium* spp.

U wszystkich pacjentów leczonych w Ośrodku Poznańskim (n=51), oznaczenie białka bogatego w histydynę swoistego dla *P. falciparum* oraz dehydrogenazy mleczanowej *Plasmodium* spp. było przeprowadzone również w dniu wypisu ze szpitala. Po zakończeniu celowanego leczenia przeciwmalarycznego z pozytywnym efektem terapeutycznym, antygeny zarodźca zimnicy utrzymywały się jeszcze we krwi obwodowej u 21 spośród 51 przypadków malarii hospitalizowanych w Klinice (41,2%). U 6 pacjentów wykryto obecność antygeny HRP-2 oraz dehydrogenazy mleczanowej (11,8%), u kolejnych 7 chorych zaobserwowano obecność tylko antygeny HRP-2 *P. falciparum* (13,7%), natomiast u pozostałych 8 osób stwierdzono nieswoistą gatunkowo dehydrogenazę *Plasmodium* spp. (15,7%). Antygeny *Plasmodium* spp. były rzadziej wykrywane we krwi obwodowej pacjentów z malarią w dniu wypisu z Kliniki, niż przed rozpoczęciem intensywnej terapii przeciwpasożytniczej i objawowej (test  $\chi^2$ ,  $P < 0,000001$ ). Ujemne wyniki testu

immunochematograficznego uzyskano po leczeniu zimnicy w 90,1% zarażeń wywołanych przez *P. vivax* oraz we wszystkich inwazjach *P. ovale* i *P. malariae*.

Najdłużej utrzymywały się antygeny w zimnicy wywołanej przez zarodźca sierpowatego w 59,4% przypadków oraz w inwazji mieszanej *P. falciparum* i *P. vivax* u 20,0% pacjentów. Antygen HRP-2 *P. falciparum* był jeszcze wykrywalny we krwi obwodowej badanych pacjentów po ukończeniu leczenia z taką samą częstością, jak nieswoista gatunkowo dehydrogenaza mleczanowa zarodźca zimnicy (test  $\chi^2$ ,  $P = 0,5$ ).

Zestawienie wyników występowania swoistych antygenów *Plasmodium* spp. we krwi obwodowej u badanych pacjentów z malarią w dniu przyjęcia do Kliniki oraz po zakończeniu specjalistycznego leczenia przeciwpasożytniczego i objawowego przedstawiono na Rycinie 42.



**Ryc. 44. Profil wykrywanych antygenów zarodźca zimnicy w teście immunochematograficznym po zakończeniu leczenia, w zależności od rozpoznania mikroskopowego u pacjentów z malarią hospitalizowanych w Klinice (n=51).** Objasnienia: HRP-2: białko bogate w histydynę swoiste dla *P. falciparum*; pLDH: nieswoista gatunkowo dehydrogenaza mleczanowa *Plasmodium* spp.

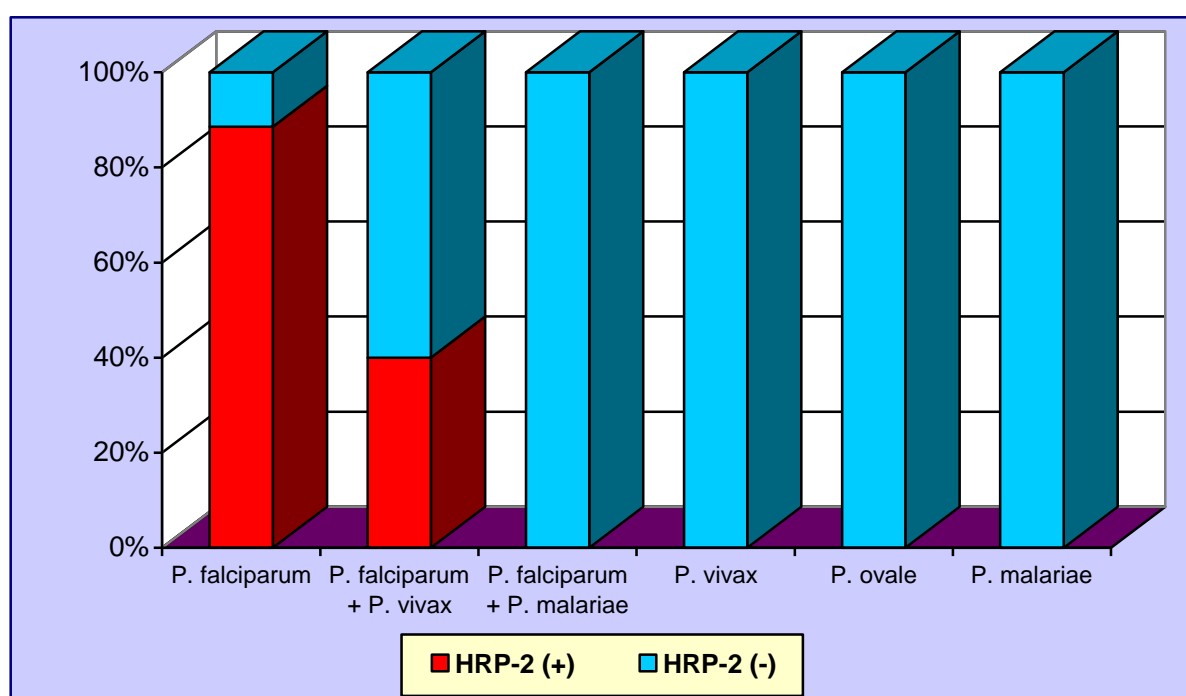
Częstość wykrywania antygenu HRP-2 *P. falciparum* oraz nieswoistej gatunkowo dehydrogenazy mleczanowej i ich profil występowania po zakończeniu leczenia malarii w Klinice, w zależności od klasycznego, mikroskopowego rozpoznania parazytologicznego przedstawiono na Rycinie 43 i 44.

W zastosowanym szybkim teście immunochromatograficznym, u żadnego z pacjentów grupy kontrolnej nie wykryto obecności antygenów charakterystycznych dla zarodźca zimnicy. Podczas wieloletniej obserwacji, dotyczącej wartości diagnostycznej testów immunochromatograficznych stosowanych w Klinice, stwierdzano jedynie pojedyncze przypadki wyników fałszywie dodatnich u pacjentów powracających z krajów tropikalnych z riketsjozą lub gorączką krwotoczną dengą. W badanym materiale klinicznym, swoistość diagnostyczna przedstawionej metody badawczej dla wykrywania izolowanego zarażenia *P. vivax* lub malarii złośliwej wywołanej przez *P. falciparum* wynosiła 100%, natomiast dla różnicowania wszystkich gatunków *Plasmodium* spp. albo rozpoznawania inwazji mieszanych kształtowała się na poziomie 98,0%. Z kolei, wartość predykcyjna ujemna zastosowanej metody badawczej dla rozpoznawania izolowanej zimnicy wywołanej przez *P. falciparum* lub *P. vivax* była wysoka i osiągała wartość 100%, dla zarażeń powodowanych przez *P. ovale* lub *P. malariae* wynosiła 98,0%, dla wszystkich inwazji mieszanych kształtowała się na poziomie 94,3%, natomiast dla wykrywania malarii niezależnie od gatunku *Plasmodium* sp. wynosiła 96,2%.

#### **4.5.5. Określenie stężenia antygenu HRP-2 *P. falciparum* we krwi obwodowej u badanych pacjentów**

Wśród 54 przypadków ostrej malarii rozpoznanych w Klinice, wartości gęstości optycznej reakcji immunoenzymatycznej ELISA dla antygenu HRP-2 *P. falciparum*, w dniu przyjęcia do szpitala, wahały się od 0,051 do 1,226 (średnia  $0,623 \pm 0,494$ ). Obecność białka bogatego w histydynę potwierdzono we krwi obwodowej u 33 badanych pacjentów, w tym u 31 osób, u których rozpoznano w tradycyjnym badaniu mikroskopowym izolowaną malarię *P. falciparum* (93,9%) oraz u 2 chorych z inwazją mieszaną *P. falciparum* i *P. vivax* (6,1%), co stanowiło 61,1% wszystkich przypadków malarii, 88,6% inwazji wywołanych wyłącznie przez *P. falciparum* oraz 80,5% zarażeń, w których jednym z wykrywanych gatunków był zarodziec sierpowaty (*P. falciparum* oraz inwazje mieszane *P. falciparum* i *P. vivax* lub *P. falciparum* i *P.*

*malariae*). U 33 pacjentów z dodatnim wynikiem testu immunoenzymatycznego, poziomy białka HRP-2 wynosiły od 0,189 do 1,226 (średnia  $0,973 \pm 0,280$ ) i korelowały z intensywnością zarażenia *P. falciparum* u tych osób. Swoistego antygeny HRP-2 nie wykryto w żadnym przypadku izolowanej zimnicy *P. vivax*, ani też w inwazjach wywoływanych przez *P. ovale* lub *P. malariae*. Częstość występowania białka bogatego w histydynę w zależności od klasycznego rozpoznania mikroskopowego gatunków zarodźca malarii u badanych pacjentów zestawiono na Rycinie 45.



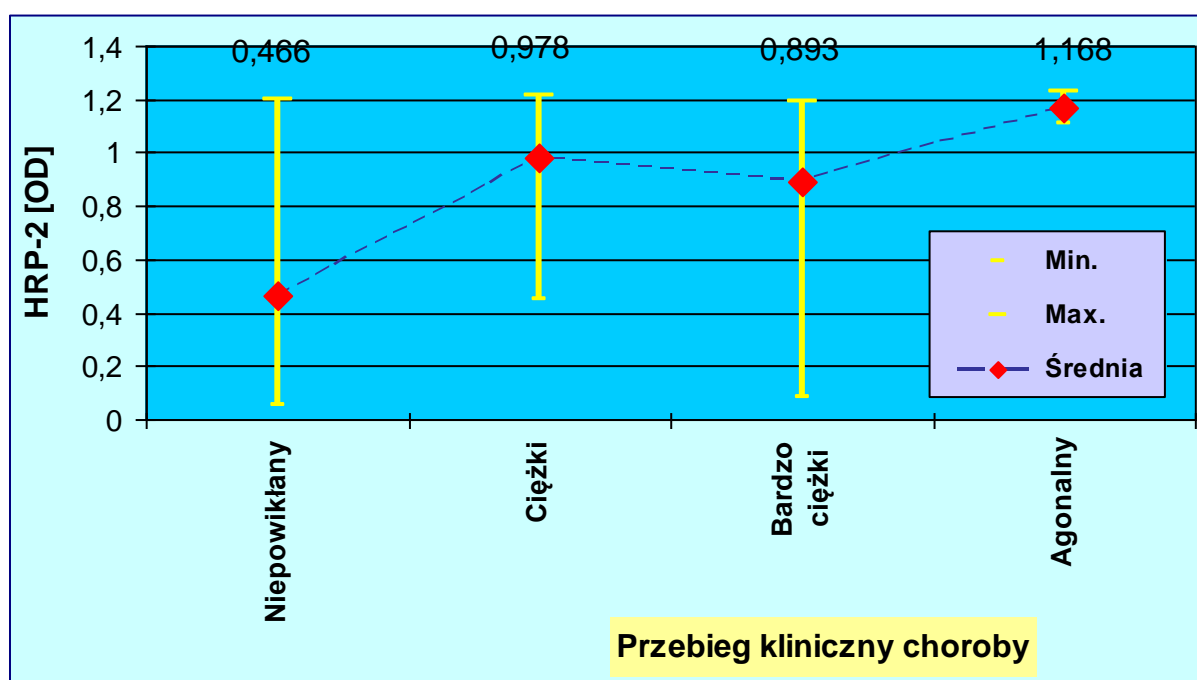
**Ryc. 45.** Częstość wykrywania antygeny HRP-2 *P. falciparum* u pacjentów z malarią hospitalizowanych lub konsultowanych w Klinice w zależności od rozpoznania mikroskopowego (n=54). Objaśnienia: HRP-2: białko bogate w histydynę swoiste dla zarodźca sierpowatego, (+): wynik dodatni, (-): wynik ujemny.

U 8 pacjentów z rozpoznaną mikroskopowo inwazją *P. falciparum* (n=4) albo malarią mieszaną *P. falciparum* i *P. vivax* (n=3) lub *P. falciparum* i *P. malariae* (n=1), w zastosowanej metodzie badawczej nie wykryto obecności białka bogatego w histydynę, swoistego dla zarodźca sierpowatego (14,8%). W pięciu badanych przypadkach, wynik fałszywie ujemny był spowodowany bardzo niskim poziomem parazytemii *P. falciparum* we krwi obwodowej (9,3%): u 3 misjonarzy - na skutek

samodzielnie zastosowanych przed przyjęciem do Kliniki leków przeciwmalarycznych (5,6%), a u pozostałych 2 chorych – wykorzystaniem do analizy antygenu HRP-2 próbki surowicy krwi obwodowej, w przypadku braku możliwości zastosowania pełnej krwi (3,7%). U jednego pacjenta z inwazją mieszaną wywołaną przez *P. falciparum* i *P. vivax*, antygen HRP-2 nie był wykrywalny w dniu przyjęcia do Kliniki, ale pojawił się w badaniu kontrolnym w teście immunochromatograficznym (1,8%). Natomiast w dwóch pozostałych przypadkach, rezultaty testu immunoenzymatycznego ELISA były zgodne z wynikami metody immunochromatograficznej (patrz podrozdział 4.5.4.) i przyczyniły się do obiektywnej weryfikacji rozpoznania parazytologicznego, wstępnie ustalonego na podstawie tradycyjnej analizy rozmazów krwi obwodowej (3,7%). U jednego pacjenta rozpoznano ostatecznie izolowaną inwazję *P. malariae*, natomiast w drugim przypadku – wyłącznie malarię *P. vivax*, bez współistniejącego zarażenia *P. falciparum*. Korelacja uzyskanych stężeń antygenu HRP-2 oznaczanych ilościową techniką immunoenzymatyczną z wynikami szybkiego testu immunochromatograficznego była porównywalna do ich zgodności z wynikami tradycyjnego badania mikroskopowego rozmazów krwi obwodowej (współczynnik korelacji rang Spearmana  $r$  odpowiednio 0,686 i 0,706). W analizowanym materiale klinicznym, czułość diagnostyczna techniki immunoenzymatycznej ELISA wykrywającej białko bogate w histydynę we krwi obwodowej wynosiła 86,8%, natomiast wartość predykcyjna dodatnia osiągała poziom 100%.

Na podstawie analizy wartości gęstości optycznej dla antygenu HRP-2 *P. falciparum* u badanych pacjentów z malarią, hospitalizowanych lub konsultowanych w Klinice, stwierdzono istotną statystycznie korelację pomiędzy stężeniem białka bogatego w histydynę, a stopniem nasilenia objawów chorobowych i powikłań zimnicy u tych osób. W przypadkach zgonów z powodu malarii poziom antygenu HRP-2 był zdecydowanie najwyższy i wynosił 1,109 - 1,226 (średnia  $1,168 \pm 0,083$ ), w zachorowaniach o przebiegu bardzo ciężkim wahał się od 0,081 do 1,188 (średnia  $0,893 \pm 0,387$ ), u pacjentów z ciężkim przebiegiem klinicznym choroby osiągał wartości od 0,452 do 1,216 (średnia  $0,978 \pm 0,259$ ), natomiast był wyraźnie najniższy u osób z zimnicą niepowikłaną i wynosił 0,051 – 1,201 (średnia  $0,466 \pm 0,488$ ). Pacjenci z malarią o przebiegu agonalnym wykazywali statystycznie wyższe wartości gęstości optycznej dla antygenu HRP-2, niż osoby z zimnicą niepowikłaną oraz misjonarze grupy kontrolnej (test T-Studenta,  $P$  odpowiednio 0,0001 i poniżej

0,000001), podobnie jak chorzy z malarią o przebiegu bardzo ciężkim (test T-Studenta,  $P$  odpowiednio 0,03 i 0,001) i ciężkim (test T-Studenta,  $P$  odpowiednio 0,0005 i 0,00002). W grupie wszystkich chorych z powikłaną zimnicą o przebiegu agonalnym, bardzo ciężkim i ciężkim, poziomy HRP-2 były znacząco wyższe, w porównaniu do pacjentów z malarią niepowikłaną i misjonarzy grupy kontrolnej (test T-Studenta,  $P$  odpowiednio 0,00003 i poniżej 0,000001). Zakresy i średnie wartości oznaczeń antygenu HRP-2 *P. falciparum* we krwi obwodowej w zależności od obrazu klinicznego malarii u badanych pacjentów przedstawiono na Rycinie 46.

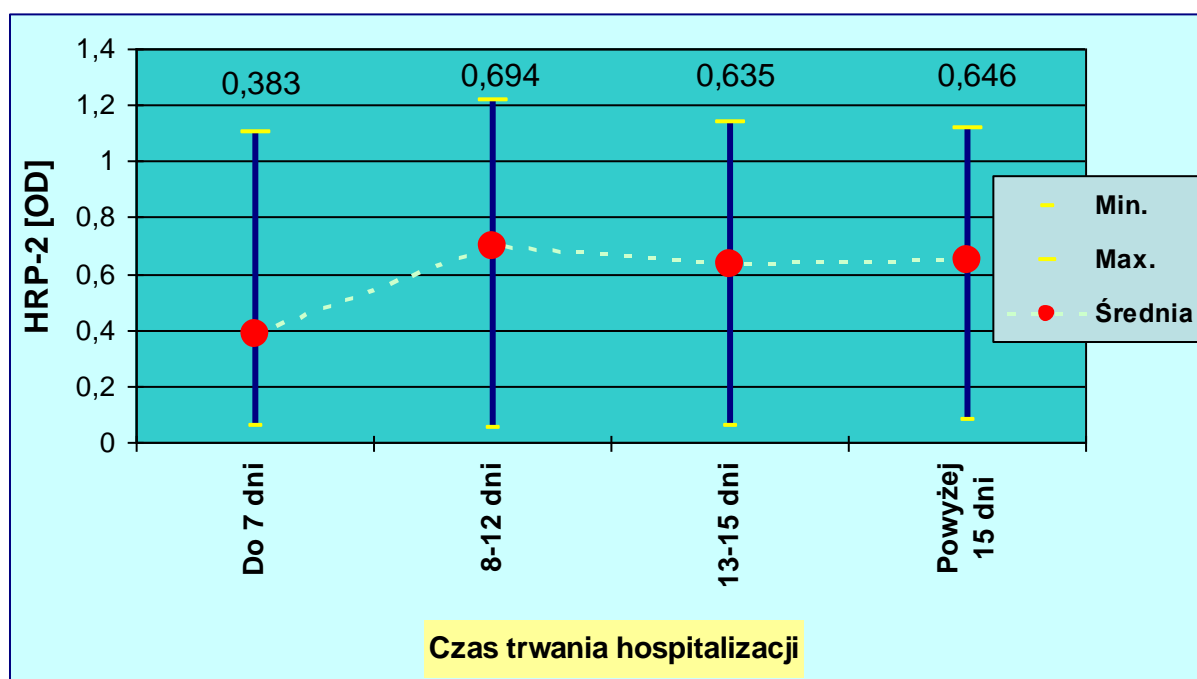


**Ryc. 46. Ocena korelacji poziomów antygenu HRP-2 *P. falciparum* we krwi obwodowej z obrazem klinicznym malarii.** Objaśnienie: HRP-2: białko bogate w histydynę swoiste dla zarodźca sierpowatego.

Na podstawie analizy danych klinicznych, dotyczących długości hospitalizacji pacjentów z malarią, leczonych w Ośrodku Poznańskim, wykazano istotną statystycznie korelację pomiędzy czasem trwania hospitalizacji, a stężeniem białka bogatego w histydynę swoistego dla zarodźca sierpowatego we krwi obwodowej. Indywidualna decyzja dotycząca czasu trwania hospitalizacji pacjentów była wynikiem analizy stanu klinicznego i wykładników badań laboratoryjnych świadczących o stopniu nasilenia objawów klinicznych i powikłań oraz ciężkości przebiegu klinicznego zimnicy. U pacjentów, którzy byli leczeni w Klinice nie dłużej niż 7 dni, zakres

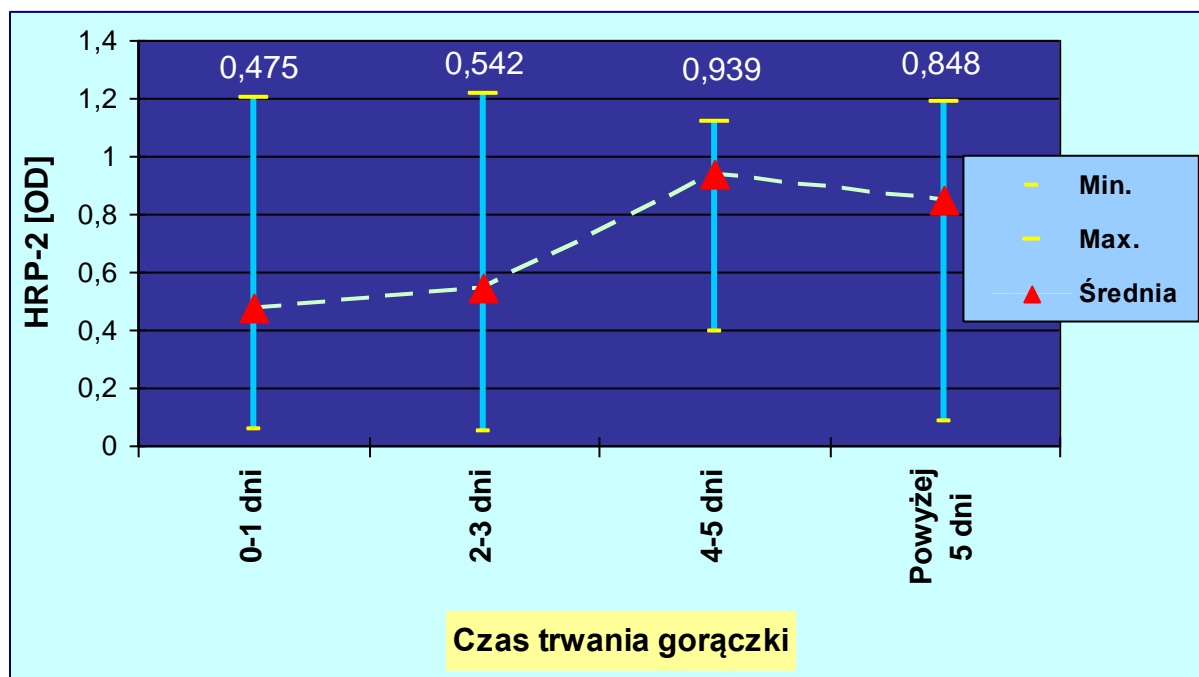


poziomów antygenu HRP-2 *P. falciparum* był najniższy i wynosił 0,057 - 1,100 (średnia  $0,383 \pm 0,440$ ), u osób hospitalizowanych przez dłuższy okres 8-12 dni osiągał on wartości 0,051 – 1,216 (średnia  $0,694 \pm 0,504$ ), w grupie chorych, którzy przebywali w szpitalu od 13 do 15 dni poziom białka HRP-2 kształtował się na wysokości 0,059 – 1,134 (średnia  $0,635 \pm 0,515$ ), natomiast u chorych, których czas trwania hospitalizacji przekraczał 15 dni osiągał on wartości rzędu 0,081 – 1,116 (średnia  $0,646 \pm 0,524$ ). Poziomy białka bogatego w histydynę u wszystkich pacjentów hospitalizowanych w Klinice powyżej 7 dni okazały się statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do chorych z krótszym czasem hospitalizacji i misjonarzy grupy kontrolnej (test T-Studenta, *P* odpowiednio 0,04 i poniżej 0,000001). Zależność wartości gęstości optycznej dla antygenu HRP-2 *P. falciparum* we krwi obwodowej od długości hospitalizacji pacjentów leczonych w Ośrodku Poznańskim przedstawiono na Rycinie 47.



**Ryc. 47. Ocena korelacji poziomów antygenu HRP-2 *P. falciparum* we krwi obwodowej z długością hospitalizacji pacjentów w Ośrodku Poznańskim.** Objaśnienie: HRP-2: białko bogate w histydynę swoiste dla zarodźca sierpowatego.

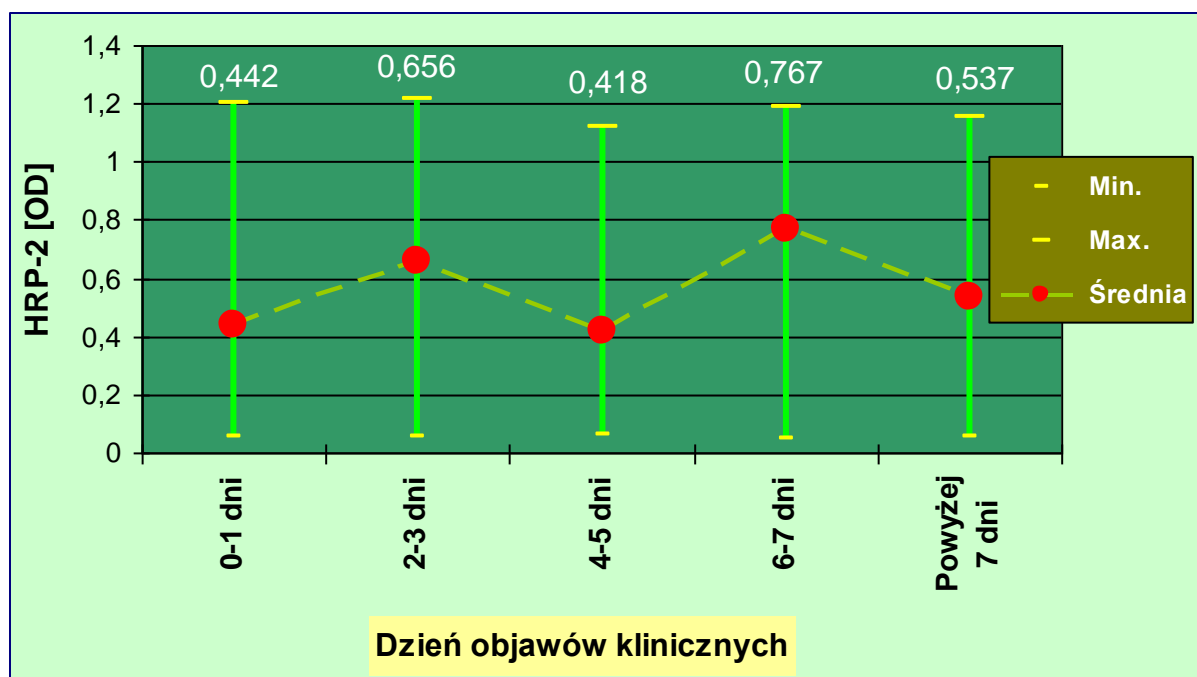
Podczas prowadzenia intensywnego leczenia przeciwpasożytniczego i objawowego, monitorowano regularnie stan kliniczny pacjenta i długość utrzymywania się stanów gorączkowych w przebiegu zimnicy. Na podstawie analizy



**Ryc. 48. Ocena korelacji poziomów antygenu HRP-2 *P. falciparum* we krwi obwodowej z długością utrzymywania się stanów gorączkowych podczas leczenia w Klinice.**  
Objaśnienie: HRP-2: białko bogate w histydynę swoiste dla zarodźca sierpowatego.

stężen białka bogatego w histydynę *P. falciparum* u pacjentów z malarią rozpoznaną w Ośrodku Poznańskim stwierdzono, że istniała bezpośrednia korelacja pomiędzy poziomami oznaczanego antygenu we krwi obwodowej, a czasem utrzymywania się gorączki jeszcze po rozpoczęciu specjalistycznego leczenia. W większości przypadków, im dłużej utrzymywały się stany gorączkowe u pacjentów z malarią w Klinice, tym wyższe były stwierdzane u nich średnie poziomy antygenu HRP-2 we krwi obwodowej. Dla pacjentów nie gorączkujących dłużej niż przez okres jednej doby poziomy białka HRP-2 osiągały zakres 0,058 – 1,201 (średnia  $0,475 \pm 0,503$ ), dla pacjentów ze stanami gorączkowymi trwającymi jeszcze przez 2-3 kolejne dni po włączeniu swoistego leczenia wartości HRP-2 wynosiły 0,051 – 1,216 (średnia  $0,542 \pm 0,507$ ), dla osób gorączkujących przez dłuższy okres 4-5 dni kształtowały się one na poziomie 0,392 – 1,116 (średnia  $0,939 \pm 0,237$ ), natomiast u chorych z gorączką utrzymującą się powyżej 5 dni osiągały wartości 0,081 – 1,188 (średnia  $0,848 \pm 0,465$ ). Poziomy antygenu HRP-2 *P. falciparum* były statystycznie istotnie wyższe u pacjentów gorączkujących przez okres co najmniej 4 dni po rozpoczęciu celowanego leczenia w kierunku malarii, w porównaniu do chorych, u których podwyższona temperatura ciała utrzymywała się tylko przez 2-3 kolejne dni (test T-Studenta,  $P =$

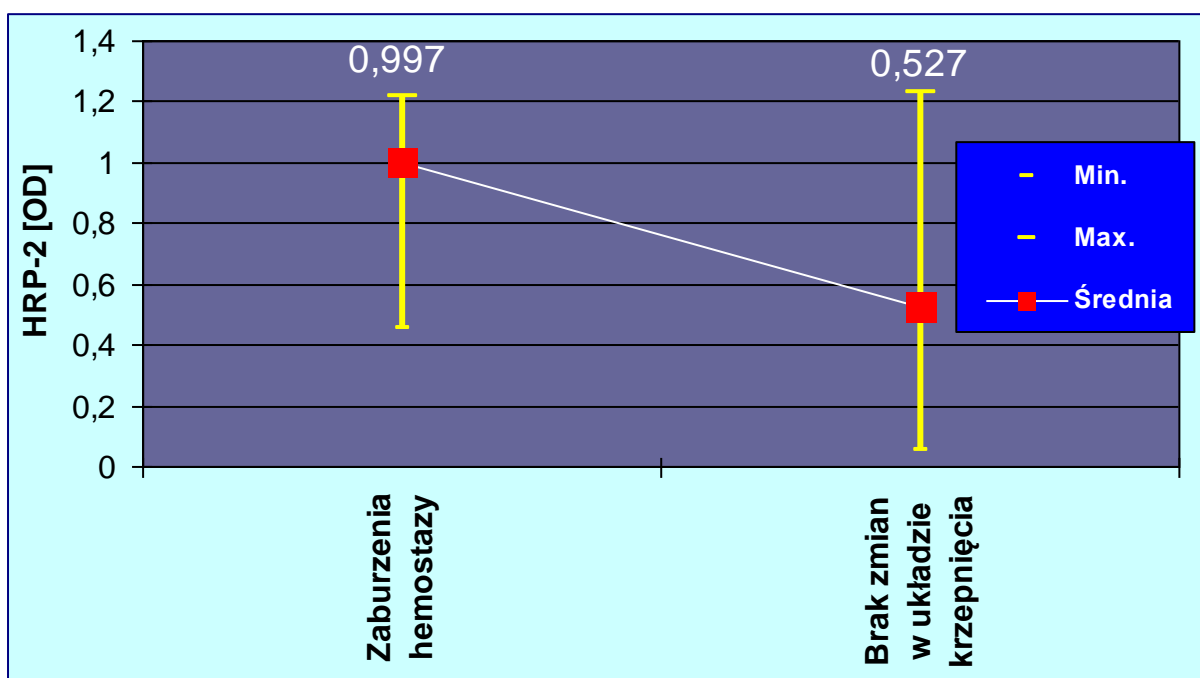
0,02) lub okres tylko jednej doby (test T-Studenta,  $P = 0,01$ ). Korelację poziomów antygeny HRP-2 *P. falciparum* we krwi obwodowej z długością utrzymywania się stanów gorączkowych u pacjentów z malarią podczas leczenia w Klinice przedstawiono na Rycinie 48.



Ryc. 49. Ocena korelacji poziomów antygeny HRP-2 *P. falciparum* we krwi obwodowej w zależności od czasu zgłoszenia się pacjentów do szpitala. Objaśnienie: HRP-2: białko bogate w histydynę swoiste dla zarodźca sierpowatego.

Czas zgłoszenia się pacjenta z objawami gorączki, sugerującymi malarię po powrocie z obszarów strefy międzyzwrotnikowej, do ośrodka medycyny tropikalnej odgrywa istotną rolę prognostyczną dla oceny stanu klinicznego chorego i możliwości uzyskania sukcesu terapeutycznego. Na podstawie analizy danych klinicznych pacjentów z malarią rozpoznaną w Klinice, zaobserwowano korelację pomiędzy poziomem antygeny HRP-2 *P. falciparum* stwierdzanym w dniu przyjęcia, a długością utrzymywania się objawów klinicznych przed skierowaniem tych chorych do szpitala. Im później pacjenci zostali przekazani do Kliniki celem wdrożenia specjalistycznego leczenia przeciwmalarycznego, tym wyższe obserwowano u nich poziomy swoistego antygeny *P. falciparum* we krwi obwodowej o niekorzystnym znaczeniu klinicznym i rokowniczym. Najniższe wartości antygeny HRP-2 *P. falciparum* wykrywano u pacjentów, u których czas trwania objawów przed przyjęciem do Kliniki nie

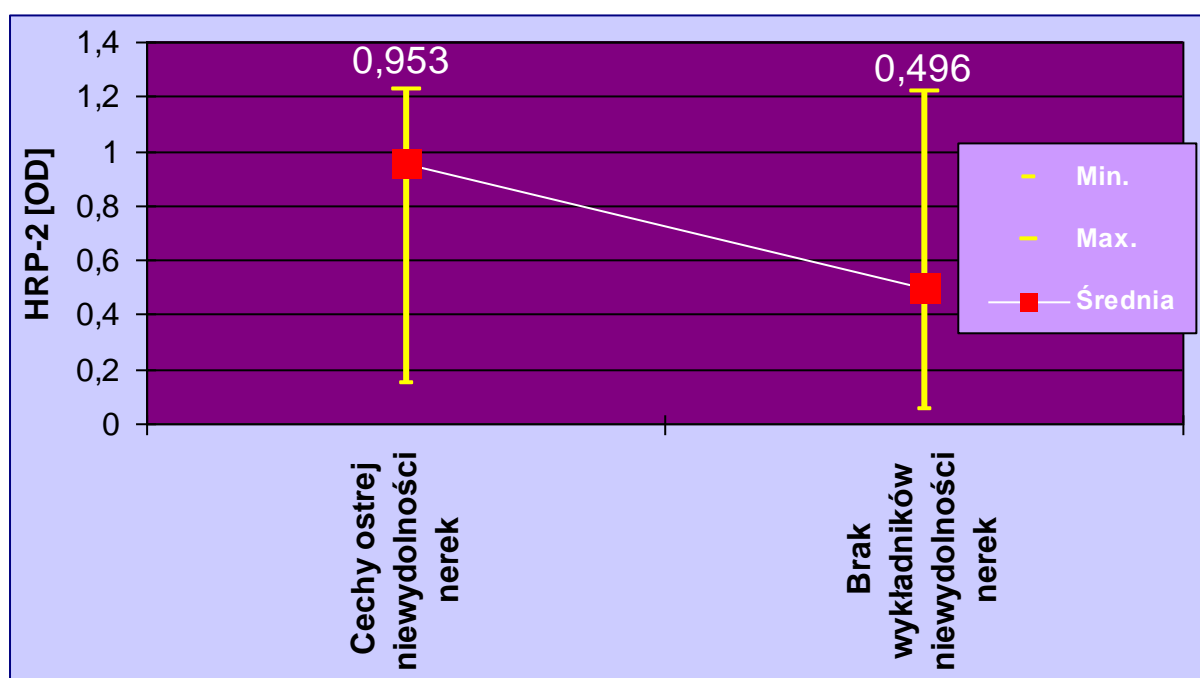
przekroczył 24 godzin (0,057 – 1,201, średnia  $0,442 \pm 0,467$ ), ale różniły się one zdecydowanie od wyników uzyskanych dla grupy kontrolnej (test T-Studenta,  $P = 0,03$ ). Średni poziom antygeny wykazywał tendencję wzrostu liniowego w grupie osób, które zostały przekazane do Ośrodka później w 2-3 i 4-5 dobie trwania objawów klinicznych choroby (0,058 -1,216, średnia  $0,605 \pm 0,516$ ) oraz po upływie 5. doby (0,051 - 1,188, średnia  $0,661 \pm 0,496$ ), ale uzyskane różnice nie były statystycznie istotne (test T-Studenta,  $P = 0,3$ ). Pacjenci, u których leczenie przeciwmalaryczne włączono najpóźniej - w 6. i 7. dobie od momentu pojawienia się objawów chorobowych, cechowali się najwyższymi, średnimi poziomami białka bogatego w histydynę (0,051 – 1,188, średnia  $0,767 \pm 0,467$ ). Wykres poziomów antygeny HRP-2 *P. falciparum* we krwi obwodowej w zależności od czasu zgłoszenia się pacjentów z malarią do szpitala przedstawiono na Rycinie 49.



**Ryc. 50. Ocena korelacji poziomów antygeny HRP-2 *P. falciparum* we krwi obwodowej w zależności od występowania cech skazy krwotocznej i zaburzeń krzepnięcia krwi.**  
 Objasnienie: HRP-2: białko bogate w histydynę swoiste dla zarodźca sierpowatego.

Na podstawie analizy danych klinicznych pacjentów, u których zaobserwowano powikłany przebieg malarii z cechami skazy krwotocznej lub laboratoryjnymi wykładnikami zaburzeń krzepnięcia krwi, w tym zespołu wykrzepiania śródnaczyniowego stwierdzono, że wartości gęstości optycznej testu

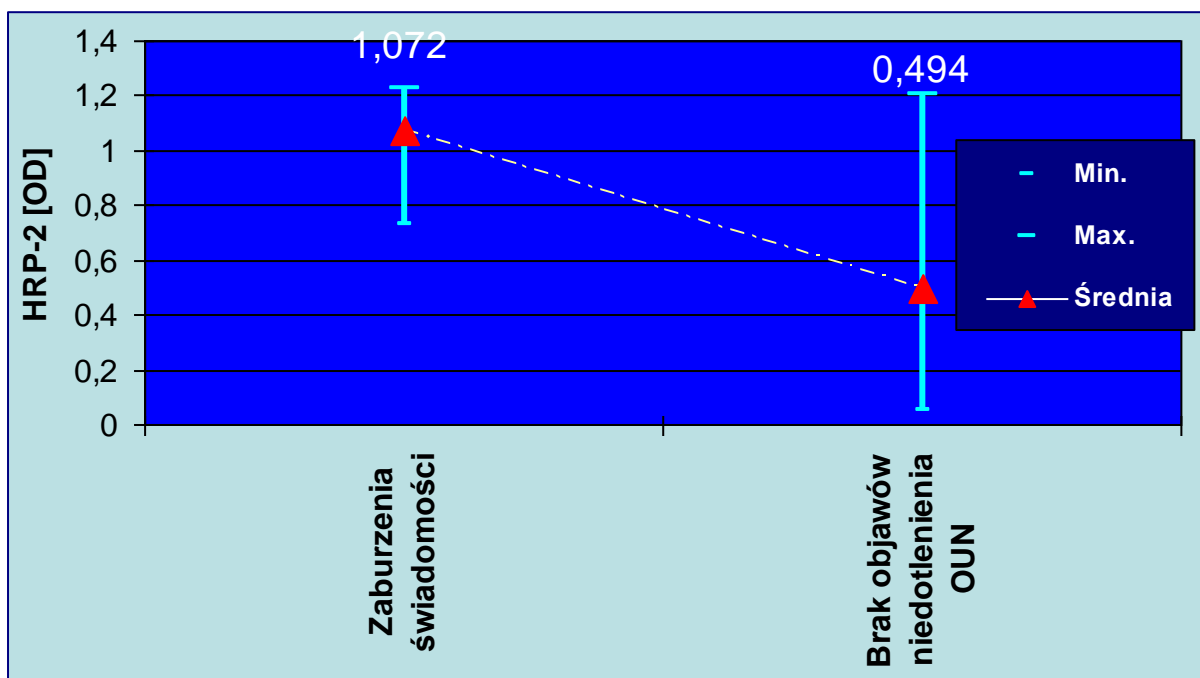
immunoenzymatycznego ELISA dla antygenu HRP-2 *P. falciparum* w tej grupie pacjentów wynosiły 0,452 – 1,216 (średnia  $0,997 \pm 0,244$ ) i były prawie dwukrotnie wyższe, niż u osób nie posiadających żadnych nieprawidłowości w zakresie układu krzepnięcia i fibrynolizy (0,051 – 1,226, średnia  $0,527 \pm 0,498$ ). Stwierdzona różnica średnich poziomów białka bogatego w histydynę w obu grupach pacjentów okazała się znamienne statystycznie (test T-Studenta,  $P = 0,0001$ ). Wykres wartości antygenu HRP-2 *P. falciparum* we krwi obwodowej w zależności od występowania cech skazy krwotocznej i laboratoryjnych zaburzeń krzepnięcia krwi u badanych pacjentów z malarią przedstawiono na Rycinie 50.



**Ryc. 51. Ocena korelacji poziomów antygenu HRP-2 *P. falciparum* we krwi obwodowej w zależności od występowania objawów niewydolności nerek.** Objasnienie: HRP-2: białko bogate w histydynę swoiste dla zarodźca sierpowatego.

Analizując pacjentów z powikłaną malarią, posiadających kliniczne objawy niewydolności nerek, takie jak oliguria, anuria lub czarnomocz zimniczy oraz podwyższony poziom kreatyniny i mocznika we krwi obwodowej, wykazano zdecydowanie wyższy poziom antygenu HRP-2 *P. falciparum* u tych chorych (0,143 – 1,226, średnia  $0,953 \pm 0,329$ ), w porównaniu do osób nie wykazujących cech zaburzeń w zakresie czynności nerek (0,051 – 1,216, średnia  $0,496 \pm 0,491$ ).

Zaobserwowana różnica średnich poziomów antygenu HRP-2 w obu grupach pacjentów była statystycznie istotna (test T-Studenta,  $P = 0,002$ ). Korelację poziomów antygenu HRP-2 *P. falciparum* we krwi obwodowej w zależności od występowania objawów niewydolności nerek u badanych pacjentów z malarią przedstawiono na Rycinie 51.

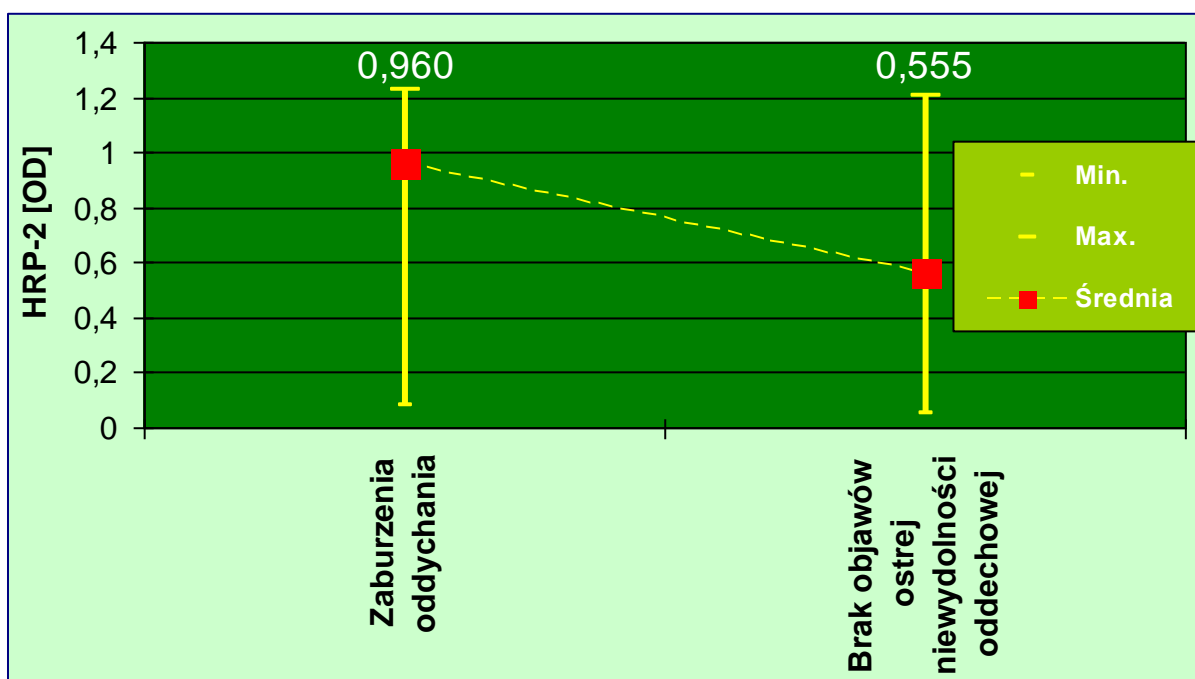


**Ryc. 52. Ocena korelacji poziomów antygenu HRP-2 *P. falciparum* we krwi obwodowej w zależności od występowania zaburzeń świadomości i cech malarii mózgowej.** Objasnienie: HRP-2: białko bogate w histydynę swoiste dla zarodźca sierpowatego.

W oparciu o wyniki badania immunoenzymatycznego stwierdzono wyraźną zależność pomiędzy poziomami antygenu HRP-2 *P. falciparum* we krwi obwodowej, a występowaniem objawów malarii mózgowej. Im silniej wyrażone były cechy niedotlenienia ośrodkowego układu nerwowego w postaci zaburzeń świadomości, tym wyższe obserwowano poziomy białka HRP-2 u badanych pacjentów. U chorych z objawami niedotlenienia ośrodkowego układu nerwowego (OUN) wartości gęstości optycznej dla antygenu HRP-2 wynosiły od 0,730 do 1,226 (średnia  $1,072 \pm 0,169$ ), natomiast u pozostałych osób wahały się one w zakresie 0,051 – 1,201 (średnia  $0,494 \pm 0,482$ ), a zaobserwowana różnica wartości HRP-2 była jednoznacznie znamienne statystycznie (test T-Studenta,  $P < 0,000001$ ). Ocenę korelacji poziomów antygenu HRP-2 *P. falciparum* we krwi obwodowej w zależności od występowania

zaburzeń świadomości i cech malarii mózgowej u badanych pacjentów z malarią przedstawiono na Rycinie 52.

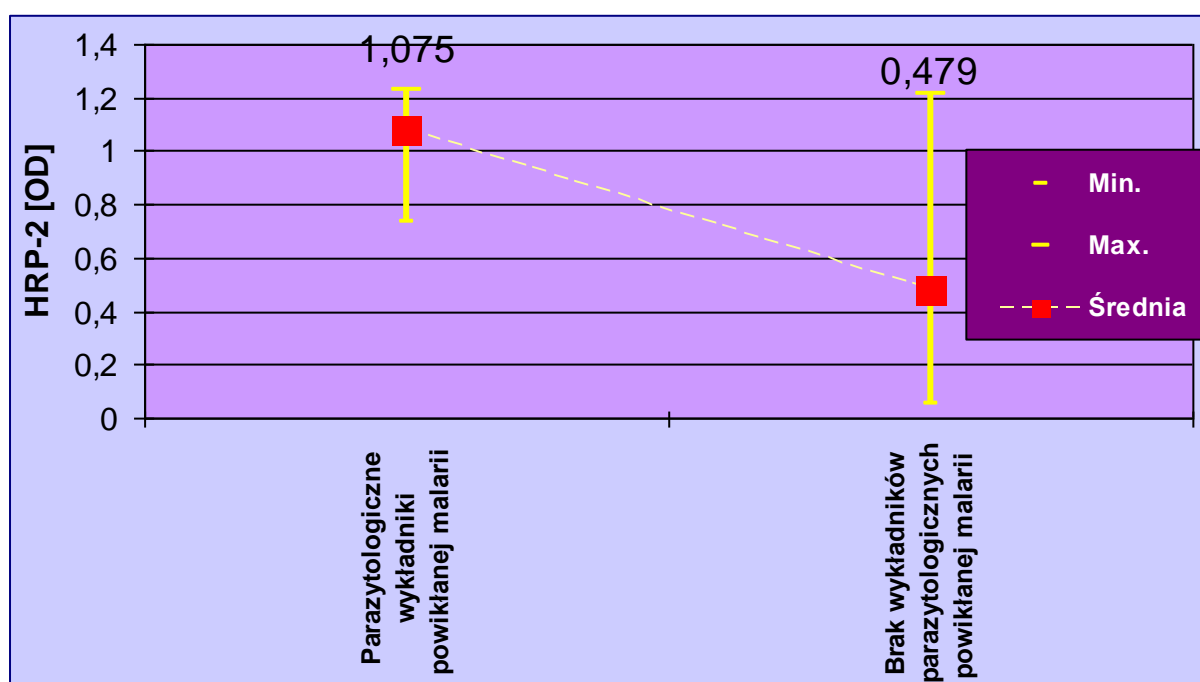
W grupie pacjentów z objawami ostrej niewydolności oddechowej w przebiegu malarii, oznaczane poziomy białka HRP-2 *P. falciparum* wynosiły 0,081 – 1,226 (średnia  $0,960 \pm 0,364$ ), natomiast u pacjentów, u których nie stwierdzano zaburzeń oddychania wahały się od 0,051 do 1,201 (średnia  $0,555 \pm 0,492$ ). Średnie poziomy białka bogatego w histydynę u pacjentów z ostrą niewydolnością oddechową okazały się zdecydowanie wyższe, w porównaniu do osób nie wykazujących zaburzeń oddychania, a uzyskana, znacząca różnica w obu porównywanych grupach pacjentów została potwierdzona analizą statystyczną (test T-Studenta,  $P = 0,02$ ). Zależność poziomów antygenu HRP-2 *P. falciparum* we krwi obwodowej od występowania objawów ostrej niewydolności oddechowej przedstawiono na Rycinie 53.



Ryc. 53. Ocena korelacji poziomów antygenu HRP-2 *P. falciparum* we krwi obwodowej w zależności od występowania objawów niewydolności oddechowej. Objasnienie: HRP-2: białko bogate w histydynę swoiste dla zarodźca sierpowatego.

Poddając analizie markery mikroskopowe powikłanej malarii *P. falciparum*, w postaci wysokiej lub krytycznej parazytemii we krwi obwodowej, obecności schizontów *P. falciparum* w erytrocytach oraz złogów hemozoiny w granulocytach obojętnochłonnych wykazano, iż pacjenci wykazujący obecność co najmniej jednego

wykładnika parazytologicznego o niekorzystnym znaczeniu prognostycznym w rozmazach krwi obwodowej, posiadali zdecydowanie wyższy poziom antygenu HRP-2 *P. falciparum* niż osoby, u których nie stwierdzano cech parazytologicznych ciężkiej zimnicy. W grupie chorych posiadających parazytologiczne wykładniki powikłanej malarii, wartości gęstości optycznej dla białka HRP-2 wynosiły 0,730 – 1,226 (średnia  $1,075 \pm 0,129$ ), natomiast u osób, u których nie stwierdzano niekorzystnych markerów prognostycznych w badaniu mikroskopowym uzyskane poziomy antygenu wahały się w zakresie od 0,051 do 1,216 (średnia  $0,479 \pm 0,481$ ). Zaobserwowana różnica w obu badanych grupach była znamienna statystycznie (test T-Studenta,  $P = 0,00005$ ). Korelację poziomów antygenu HRP-2 *P. falciparum* we krwi obwodowej w zależności od występowania niekorzystnych prognostycznie markerów parazytologicznych powikłanej malarii u badanych pacjentów przedstawiono na Rycinie 54.



**Ryc. 54. Ocena korelacji poziomów antygenu HRP-2 *P. falciparum* we krwi obwodowej w zależności od występowania parazytologicznych wykładników powikłanej malarii w klasycznym badaniu mikroskopowym.** Objaśnienie: HRP-2: białko bogate w histydynę swoiste dla zarodźca sierpowatego.

U wszystkich pacjentów leczonych w Ośrodku Poznańskim (n=51), oznaczenie białka bogatego w histydynę swoistego dla *P. falciparum*, przy pomocy reakcji



immunoenzymatycznej ELISA, przeprowadzano również w dniu wypisu z Kliniki. Po zakończeniu skutecznej terapii przeciwmalarycznej, wartości gęstości optycznej dla antygeny HRP-2 wahały się od 0,055 do 0,995 (średnia  $0,236 \pm 0,305$ ) i były statystycznie istotnie niższe niż w dniu przyjęcia do Kliniki (test T-Studenta,  $P = 0,00003$ ). Antygen HRP-2 *P. falciparum* utrzymywał się jeszcze we krwi obwodowej u 10 spośród 39 przypadków malarii (25,6%), w których jednym z rozpoznanych gatunków był zarodziec sierpowaty (*P. falciparum* oraz inwazja mieszana *P. falciparum* i *P. vivax*), a wartości gęstości optycznej wynosiły u tych pacjentów od 0,195 do 0,995 (średnia  $0,678 \pm 0,245$ ). Wykazano statystycznie istotną różnicę między wysokością dodatnich poziomów antygeny HRP-2 w dniu przyjęcia do szpitala oraz wyników uzyskanych po leczeniu malarii u tych chorych (test T-Studenta,  $P = 0,004$ ). Wśród 10 pacjentów z dodatnim stężeniem białka bogatego w histydynę po zakończeniu swojego leczenia przeciw pasożytniczego (18,5%), ciężką postać kliniczną malarii rozpoznano u 4 pacjentów z (40,0%), bardzo ciężki przebieg zimnicy stwierdzono u 3 osób (30,0%), natomiast u 3 pozostałych chorych wykryto malarię niepowikłaną (30,0%). Podczas hospitalizacji, w obrazie klinicznym zimnicy, objawy skazy krwotocznej i zaburzenia w układzie krzepnięcia i fibrynolizy występowały w 6 badanych przypadkach (60,0%), zaburzenia świadomości obserwowano u 5 osób (50,0%), cechy niewydolności nerek z czarnomoczem zimniczym pojawiły się u 3 chorych (30,0%), zespół zaburzeń oddychania stwierdzono u 4 chorych, markery kwasicy metabolicznej wykryto u 2 osób (20,0%), malarię powikłaną zapaścią naczyniową u jednej osoby (10,0%), a niekorzystne prognostycznie wykładniki parazytologiczne inwazji *P. falciparum* wykryto w rozmazach krwi obwodowej u 6 pacjentów (60,0%); u 8 spośród 10 badanych stwierdzono obecność kilku wykładników klinicznych i laboratoryjnych powikłanej malarii tropikalnej (80,0%).

U żadnego z pacjentów grupy kontrolnej ( $n=50$ ), nie stwierdzano obecności antygeny HRP-2 *P. falciparum* we krwi obwodowej w teście immunoenzymatycznym, a uzyskane wartości gęstości optycznej mieściły się w niskim przedziale od 0,055 do 0,073 (średnia  $0,061 \pm 0,004$ ). Swoistość diagnostyczna zastosowanej metody badawczej dla białka HRP-2 okazała się więc bardzo wysoka i wynosiła 100%, natomiast wartość predykcyjna ujemna kształtowała się na poziomie 89,3%.

## 5. DYSKUSJA

### 5.1. Zagrożenie malarią dla osób podróżujących do krajów odmiennej strefy klimatyczno-sanitarnej

Malaria od dawna wywiera ogromny wpływ na zdrowie i życie społeczeństw oraz systemy ekonomiczne wielu krajów położonych w strefie endemicznej. Problemy związane z tą groźną dla człowieka pasożytniczą chorobą egzotyczną stale narastają, gdyż rejony zagrożone ryzykiem występowania zimnicy stale zwiększają swój zasięg geograficzny, w środowisku najbliższym człowiekowi pojawiają się szczepy zarodźców coraz bardziej odporne na stosowane dotąd leki przeciwmalaryczne, a liczba osób podróżujących do krajów strefy gorącej ciągle się zwiększa. Te czynniki powodują, że liczba osób narażonych na zachorowanie na zimnicę, w tym trudną w leczeniu malarię wielolekooporną, rośnie w ostatnich latach w gwałtownym tempie (Wongsrichanalai i wsp., 2002). W rejonach endemicznych wprowadzono wiele programów narodowych, nadzorowanych przez Światową Organizację Zdrowia, mających za zadanie zmniejszenie liczby zachorowań i ciężkich powikłań wielonarządowych z uwzględnieniem zgonu. Jednym z projektów oświaty zdrowotnej jest szerokie propagowanie wiedzy na temat stosowania mechanicznych barier przeciwko ukłuciom komarów, jako najbardziej optymalnej formy profilaktyki oraz masowe zaopatrywanie lokalnych społeczności w moskitiery i siatki chroniące przed owadami (Blackburn i wsp., 2006; Al-Taiar i wsp., 2009; Kleinschmidt i wsp., 2009; Bayoh i wsp., 2010). Nie zmienia to jednak faktu, że nadal w każdym przypadku objawowego zarażenia *Plasmodium* spp., postawienie diagnozy i jak najszybsze włączenie leczenia przyczynowego jest sprawą zasadniczą. Narastająca oporność zarodźców malarii na leki powoduje, że w rejonach wielolekooporności pasożytów wprowadza się nowe schematy leczenia, często bardzo drogiego i obciążonego wieloma działaniami ubocznymi (Hutagalung i wsp., 2005; Whitti i wsp., 2008; Carrara i wsp., 2009). Problem ten dodatkowo komplikuje proces diagnostyczno-leczniczy i powoduje konieczność usprawniania dostępnych metod diagnostycznych lub poszukiwania nowych rozwiązań, które będą bardziej precyzyjne, łatwe w wykonaniu oraz szeroko dostępne i tanie.

W rejonach nie-endemicznych, większość przypadków zimnicy stanowi malaria zawlekana z krajów tropikalnych, co powoduje, że liczba przypadków zachorowań jest na tych obszarach stosunkowo niska, przez co wielu lekarzy różnych

specjalności klinicznych pomija ją zwykle w diagnostyce różnicowej, a tym samym opóźnia ustalenie prawidłowego rozpoznania i wdrożenie właściwego leczenia (de Laval i wsp., 2010; Abanyie i wsp., 2011). Stąd też malaria stanowi zwykle niebezpieczny i niedoceniany problem w rozpoznawaniu różnicowym stanów gorączkowych i objawów niewydolności wielonarządowej na terenach nie-endemicznych Europy, Ameryki Północnej i Australii.

Niezwykle prężny rozwój komunikacji, łączności, informatyzacji i infrastruktury turystycznej spowodował gwałtowny wzrost migracji wśród ludności wszystkich kontynentów i różnorodnych rejonów geograficzno-środowiskowych świata, ze szczególnym uwzględnieniem międzyzwrotnikowych obszarów strefy gorącej. Odległe podróże do najbardziej oddalonych i dotychczas niedostępnych zakątków świata, wiążą się nieodłącznie ze zwiększoną predyspozycją do występowania zagrożeń zdrowotnych, w zakresie rzadko do niedawna notowanych pasożytniczych i infekcyjnych chorób egzotycznych. W ostatnich latach w Polsce, również obserwuje się gwałtownie narastającą liczbę osób podróżujących do krajów odmiennej strefy geograficzno-środowiskowej i sanitarno-higienicznej. Wśród pacjentów zgłaszających się do Kliniki Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, znaczący odsetek chorych stanowiły osoby z dolegliwościami klinicznymi po podróży z obszarów strefy gorącej, z czego prawie połowa to misjonarze i wolontariusze akcji humanitarnych, pracujący w krajach tropikalnych o skromnym poziomie ekonomicznym i trudnych warunkach klimatycznych oraz wysokim narażeniu na infekcyjne i pasożytnicze choroby egzotyczne. Najczęstszą przyczyną hospitalizacji tych chorych były stany gorączkowe oraz zakażenia i zarażenia przewodu pokarmowego po podróży zagranicznej, a ostra i przebyta malaria stanowiła aż 1/3 wszystkich przypadków leczonych w Klinice po powrocie z obszarów międzyzwrotnikowych i subtropikalnych. Podczas prowadzenia badań objętych tematyką rozprawy doktorskiej, zaobserwowano istotną zmianę profilu pacjentów hospitalizowanych i konsultowanych w Klinice – z rodzimych inwazji pasożytniczych leczonych w latach ubiegłych, na coraz częstsze zarażenia egzotyczne importowane do kraju z obszarów strefy gorącej.

**Przeprowadzone w Klinice badania są aktualnie najpełniejszym opracowaniem epidemiologicznym przypadków malarii importowanych do Polski z krajów odmiennej strefy klimatyczno-środowiskowej, w zakresie miejsca i kierunku wyjazdu do tropiku, charakteru i celu podróży, długości**

**pobytu w strefie endemicznej oraz szczegółowych czynników ryzyka dotyczących stosowania profilaktyki mechanicznej i farmakologicznej.** Spośród przypadków zimnicy rozpoznanych w Ośrodku Poznańskim, zdecydowaną większość pacjentów stanowiły osoby, które nie odbyły przedwyjazdowej konsultacji medycznej u specjalisty chorób tropikalnych lub medycyny podróży (87,0%), ignorowały zasady profilaktyki zdrowotnej i higieny tropikalnej lub przyjmowały niewłaściwe dla danego rejonu świata chemioprolaktyczne leki przeciwmalaryczne (93,6%) oraz przebywały w strefie endemicznej w celach zawodowych przez dłuższy okres czasu, przekraczający 2 tygodnie (53,2%). Znaczna część pacjentów podróżowała do tropiku wielokrotnie (68,1%), a prawie połowa badanych przechorowała już malarię w przeszłości (44,7%). Podobnie, jak w przypadku innych krajów europejskich, głównym obszarem ryzyka zarażenia *Plasmodium* spp. dla Polaków i imigrantów przyjeżdżających do naszego kraju z obszarów endemicznych okazała się Afryka Środkowa, zwłaszcza Kamerun, Ghana i Nigeria, a rzadziej wyspy Indonezji czy Oceanii, a przeważającym gatunkiem pierwotniaka stwierdzanym u osób powracających z tropiku był zarodek sierpowaty. Jednakże w przeciwieństwie do innych przypadków zimnicy zawlekanych do Europy i leczonych w wiodących europejskich instytutach medycyny tropikalnej, głównym czynnikiem ryzyka wśród mieszkańców Polski okazały się podróże o charakterze służbowym i misyjnym, a nie przyjazdy uchodźców z obszarów endemicznych, czy też odwiedziny krewnych i znajomych przez imigrantów z Afryki (Mühlberger i wsp., 2004; Jelinek, 2008; TropNetEurop, dane niepublikowane).

## **5.2. Trudności kliniczne i diagnostyczne w rozpoznawaniu malarii**

Malaria jest chorobą, którą cechuje bardzo różnorodny obraz kliniczny, co w znacznym stopniu utrudnia ustalenie rozpoznania. Do czynników wpływających na przebieg choroby należy przede wszystkim: (i) gatunek zarodźca zimnicy, (ii) wiek osoby zarażonej, który modyfikuje stan odporności i zdolność do syntezy swoistych przeciwciał przeciwmalarycznych, będących główną linią obrony przed inwazją oraz (iii) stan ogólny chorego, (iv) stan odżywienia, a także (v) obecność chorób współistniejących, wśród których znaczenie zasadnicze mają choroby upośledzające funkcję układu odpornościowego (np. zakażenie wirusem HIV i wiele innych chorób o charakterze przewlekłym) (Atarvanis-Tsakonas i wsp., 2003). U wszystkich pacjentów

powracających z rejonów endemicznych z objawami gorączki, malarię należy nie tylko podejrzewać, ale przede wszystkim ją wykluczyć (Pawłowski i Stefaniak, 2004). Niezależnie od postaci klinicznej choroby, tzn. malarii łagodnej, czy złośliwej, ustalenie właściwego rozpoznania ma zasadnicze znaczenie, gdyż decyduje o momencie włączenia celowanego leczenia, warunkującego - głównie w grupie chorych zwiększonego ryzyka - ocalenia ich zdrowia i życia. Podróżni szczególnie narażeni na inwazję *Plasmodium* spp., do których zaliczają się turyści wyjeżdżający do rejonów endemicznego występowania zimnicy, uchodźcy i repatrianci, osoby odwiedzające znajomych i członków rodzin, przebywających na stałe w krajach tropikalnych, pracownicy akcji humanitarnych, osoby wyjeżdżające do tropiku w celach zawodowych - to osoby bez wcześniejszego kontaktu z zarodźcem zimnicy, czyli całkowicie pozbawione jakiegokolwiek formy ochrony przed rozwojem ciężkiej postaci choroby. Tylko pacjenci, którzy chorowali na malarię w przeszłości, a najczęściej osoby z wielokrotnymi epizodami zimnicy w wywiadzie, są zdolne do szybkiej syntezy efektywnie działających przeciwciał, niszczących formy rozwojowe pasożytów przed rozwinięciem ciężkich ogólnoustrojowych powikłań zimnicy. Ze względu na dużą zmienność antygenów powierzchniowych zarodźca zimnicy, wykształcenie odporności chroniącej całkowicie przed malarią nie jest możliwe. Dlatego tak ogromne znaczenie odgrywa aktualnie edukacja zdrowotna i propagowanie wiedzy na temat zimnicy, rozpowszechnianie metod diagnozowania malarii i zwiększanie dostępu do nich nawet w najbardziej odległych zakątkach rejonów endemicznych, stałe udoskonalanie obecnych sposobów rozpoznawania, a także rozwój nowych metod diagnostycznych, które będą szybkie, czułe i swoiste oraz przystępne cenowo dla krajów rozwijających się.

Głównym czynnikiem kształtującym przebieg kliniczny choroby jest gatunek i szczep zarodźca malarii. *P. vivax*, *P. ovale* i *P. malariae* wywołują najczęściej malarię niepowikłaną (łagodną), której nazwa wynika z łagodniejszego przebiegu klinicznego zarażenia, w porównaniu do malarii złośliwej wywoływanej przez *P. falciparum* i *P. knowlesi* (Cox-Singh i wsp., 2008). W malarii łagodnej nie dochodzi do zajęcia wielu narządów wewnętrznych, gdyż patogenezą choroby wiąże się z zajęciem erytrocytów, wątroby i śledziony, a tylko w rzadkich przypadkach także płuc w zarażeniu *P. vivax*. Do ostrych objawów malarii łagodnej, które pojawiają się w pierwszej fazie napadu należą dreszcze, poprzedzające wzrost temperatury ciała chorego, które są najsilniejsze w symptomatologii człowieka. Jest to tzw. okres

zimny, po którym następuje drugi okres napadu z gorączką do 40°C, czyli okres gorący. Ostry rzut malarii kończy faza zlewnych potów, towarzyszących obniżaniu się temperatury ciała pacjenta. Typowe dla napadu malarii dreszcze z towarzyszącą gorączką należy różnicować z szeregiem chorób internistycznych i zakaźnych np.: posocznica, różą, ciężkim zakażeniem bakteryjnymi, zapaleniem płuc, grypą, leptospirozą, riketsjozami, niektórymi postaciami gruźlicy, zapaleniem wsierdza, przełomem hemolitycznym, kolagenozami oraz ropniami o różnej etiologii i lokalizacji (Mtove i wsp., 2011). Objawy ostrego epizodu zimnicy utrzymują się zwykle od 6 do 10 godzin i mają tendencję do wielokrotnych, nieregularnych nawrotów. Leki przeciwmalaryczne pobierane profilaktycznie, a także inne leki stosowane w chorobach przewlekłych oraz leki przeciwgorączkowe i antybiotyki modyfikują obraz kliniczny choroby (Kocięcka i wsp., 2000). Dodatkowe objawy ostrego rzutu malarii, takie jak nasilony niepokój, bóle mięśniowo-stawowe, objawy zapalenia oskrzeli, ból w prawym podżebrzu, nudności i wymioty, mogą także komplikować obraz kliniczny i utrudniać lub opóźniać właściwe rozpoznanie choroby.

Jeszcze większe trudności diagnostyczne sprawia malaria złośliwa, która ze względu na skomplikowany proces patogenetyczny związany z blokowaniem drobnych naczyń włosowatych narządów wewnętrznych przez krwinki czerwone zarażone przez *P. falciparum*, może w swym obrazie klinicznym sugerować wiele innych jednostek chorobowych (WHO, 2000). Sytuację diagnostyczną utrudnia aktualnie brak periodyki objawów klinicznych. Do najczęstszych masek klinicznych malarii złośliwej należą: postać mózgowa, płucna, nerkowa, żołądkowo-jelitowa, wstrząsowa, hipoglikemiczna i hemolityczna (Cook i Zumla, 2009; Dzbeński i wsp., 2009).

Objawy malarii mózgowej są bardzo zróżnicowane i wynikają z mnogości zmian patologicznych zachodzących w tkankach mózgowia. Efektem niedotlenienia ośrodkowego układu nerwowego jest masywny wyrzut cytokin prozapalnych aktywujących komórki śródbłonki naczyń do nasilonej produkcji syntetazy tlenu azotu i zwiększonego uwalniania tlenu azotu. Tlenek azotu rozszerza naczynia mózgowia i zwiększa przepuszczalność bariery krew-mózg, co skutkuje zwiększonym przepływem mózgowym i uogólnionym obrzękiem tkanek. Tlenek azotu uwalniany w nieprawidłowych ilościach powoduje także zaburzenia w uwalnianiu neurotransmiterów i w związku z tym, do kolejnych objawów zajęcia ośrodkowego układu nerwowego w przebiegu zimnicy należą: jakościowe i ilościowe zaburzenia

świadomości do śpiączki włącznie oraz drgawki sugerujące rozpoznanie epilepsji (Genton i wsp., 1994). W przypadku ciężkich postaci zimnicy mózgowej, gdy do zaburzeń laboratoryjnych dołącza się pełnoobjawowy zespół wykrzepiania wewnątrznaczyniowego, powodujący destrukcję neurocytów przez wybroczyny i krwotoki do tkanki mózgowej oraz masywny napływ komórek zapalnych, które niszcząc pasożyty uszkodzają komórki nerwowe, u pacjenta może pojawić się: sztywne ustawienie gałek ocznych, zniesienie odruchu rogówkowego i odruchów brzusznych, pojawienie się odruchu podeszwowego, zaburzenia napięcia mięśni ze sztywnością z odkorowania lub sztywnością odmóżdzeniową włącznie. Objawy malarii mózgowej w postaci silnego bólu głowy i gorączki, które pojawiają się najwcześniej w obrazie klinicznym, imitują rozpoznanie zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych. U dzieci częstym objawem malarii są zaburzenia napięcia mięśni, co może sugerować także zakażenie *Clostridium tetani*, w tym teżec noworodkowy w przypadku malarii wrodzonej. Częstą manifestacją malarii mózgowej są także zaburzenia psychiczne.

W wielu przypadkach malarii narządowej, głównym łożyskiem naczyniowym zablokowanym przez zarażone erytrocyty są naczynia nerek, co skutkuje utrudnioną filtracją kłębuszkową i oligurią lub anurią w obrazie klinicznym. Nasiloną hemoliza krwinek w naczyniach jest przyczyną znacznej hemoglobinurii i ostrej martwicy cewek nerkowych, ujawniającej się pod postacią czarnomoczu zimniczego. W ciężkiej postaci malarii często dochodzi do ostrej niewydolności nerek, którą nasila postępująca hipowolemia i wstrząs. Zakażenie zarodźcem zimnicy i odkładanie się kompleksów immunologicznych w kłębuszkach nerkowych może także wywołać kłębuszkowe zapalenie nerek, które w przypadku inwazji *P. malarie* doprowadza do niewydolności nerek i konieczności przewlekłej dializoterapii w ciągu 2 lat od zarażenia.

Objawem bardzo niespecyficznym, sugerującym często mylne rozpoznanie zapalenia oskrzeli lub płuc, jest kaszel. Przyczyną kaszlu są krwotoki do pęcherzyków płucnych, które wynikają ze zwiększenia przepuszczalności naczyń włosowatych w łożysku płucnym i świadczą o znacznej patologii układu oddechowego. W skrajnej postaci malarii płucnej dochodzi do niewydolności oddechowej z *tachypnoe*, wciąganiem międzyżebry i sinicą, które dodatkowo nasila uogólniona kwasica metaboliczna. Powyższe objawy wskazują na zespół ostrej niewydolności oddechowej (ARDS), który często wymaga leczenia w oddziałach

intensywnej opieki medycznej i przewlekłej wentylacji mechanicznej z użyciem respiratora.

W postaci wątrobowej malarii, dominuje uszkodzenie wątroby z żółtaczką, zaburzeniem syntezy białek i elementów układu krzepnięcia oraz upośledzeniem procesu utylizacji toksyn egzogennych i endogennych. Następstwem niewydolności wątroby jest encefalopatia wątrobowa. Powiększenie wątroby i obrzęki obwodowe to cechy niewydolności krążenia.

Objawy malarii w postaci gorączki i hepatosplenomegalii, którym towarzyszą krwawienia i bladość powłok ciała i błon śluzowych mogą sugerować mylne rozpoznanie chorób układu krwiotwórczego. Podobne objawy mogą wystąpić w przypadku zachorowania na gorączki krwotoczne, dlatego należy je koniecznie brać pod uwagę w diagnostyce różnicowej zimnicy. Żółtaczka z gorączką, dreszczami oraz bólem spowodowanym rozciągnięciem torebki powiększonej wątroby to objawy charakterystyczne dla kamicy lub zapalenia dróg żółciowych, wymagających natychmiastowej konsultacji chirurgicznej. Częstym powikłaniem chirurgicznym malarii łagodnej jest pęknięcie powiększonej śledziony, zwłaszcza w inwazjach wywoływanych przez *P. vivax*.

Częstymi objawami malarii są także dolegliwości ze strony przewodu pokarmowego, takie jak biegunka, nudności i wymioty, które są bardzo niespecyficzne i mogą sugerować raczej zakażenie bakteryjne lub wirusowe przewodu pokarmowego, nieswoiste stany zapalne, zatrucie pokarmowe, nietolerancję pokarmową, niż zimnicę. Objawy typowe dla malarii np. gorączka, powiększenie wątroby i śledziony, bóle mięśniowo-stawowe występują także w wielu innych chorobach pasożytniczych, takich jak leishmanioza trzewna, ostra i przewlekła schistosomoza, włośnica oraz pełzakowica jelitowa i pozajelitowa.

Malaria złośliwa jest stanem zagrożenia życia w każdym przypadku zachorowania, niemniej w rejonach endemicznych, zdecydowanie łatwiej jest podejrzewać malarię w każdym przypadku stanów podgorączkowych, gorączkowych i objawów niespecyficznych niż w krajach rozwiniętych.

U osób powracających z krajów tropikalnych, każdy incydent gorączki, który pojawi się w związku z podróżą, po upływie co najmniej tygodnia od momentu ekspozycji, powinien być bezwzględnie podejrzewany o malarię i wymaga zgłoszenia się w ciągu 24 godzin do najbliższego oddziału medycyny tropikalnej lub chorób zakaźnych. Badania mikroskopowe krwi obwodowej są metodą diagnostyczną z



wyboru dla bezpośredniego, parazytologicznego potwierdzenia zarażenia *Plasmodium* spp. (Rehlis i wsp., 1998; Stefaniak i Paul, 2010). W przypadku braku możliwości wykonania badania mikroskopowego przez doświadczonego diagnostę, dla rozpoznania malarii może okazać się przydatne wykrycie splenomegalii wraz z towarzyszącą trombocytopenią i niedokrwistością w podstawowych badaniach laboratoryjnych (Magill, 2006).

Spośród 54 przypadków malarii rozpoznanych w Klinice, u większości pacjentów stwierdzono łagodny przebieg kliniczny choroby (68,5%), natomiast u pozostałych osób zdiagnozowano malarię powikłaną o przebiegu ciężkim, bardzo ciężkim lub agonalnym, na podstawie aktualnie obowiązującego systemu klasyfikacji malarii wg Światowej Organizacji Zdrowia. Wysoka gorączka przy przyjęciu lub w wywiadzie była wiodącym objawem klinicznym stwierdzanym u wszystkich badanych, której towarzyszyła najczęściej spleno- lub hepatomegalia u ponad 60% pacjentów z malarią. Spośród podstawowych wykładników laboratoryjnych, możliwych do oznaczenia w każdym laboratorium i nasuwających wysokie podejrzenie zimnicy należała trombocytopenia wykrywana w ponad 70% przypadków malarii. Triada objawów kliniczno - laboratoryjnych w postaci wysokiej gorączki poprzedzonej dreszczami, hepatosplenomegalii i trombocytopenii okazała się najbardziej przydatna w praktycznym rozpoznawaniu zimnicy. Do najczęściej obserwowanych powikłań należała niewydolność nerek z czarnomoczem zimniczym (22,2%), zaburzenia świadomości i malaria mózgowa (22,2%) i żółtaczką (22,2%), natomiast rzadziej stwierdzano objawy niewydolności oddechowej (16,7%) lub cechy skazy krwotocznej z zespołem wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (7,4%). Do niekorzystnych wykładników prognostycznych zaobserwowanych w dwóch przypadkach zgonów na oddziałach chorób zakaźnych należały cechy niewydolności wielonarządowej, przy bardzo wysokiej parazytemii we krwi obwodowej oraz obecności złogów hemozoiny w granulocytach obojętnochłonnych u jednego z nich. Wieloośrodkowe badania przeprowadzone przez Brunella i współpracowników wykazały, iż spośród pacjentów z powikłaną malarią hospitalizowanych we Francji na oddziałach intensywnej opieki medycznej, do złych rokowniczo markerów agonalnej malarii należała wysoka parazytemia, zaburzenia świadomości oraz starszy wiek chorych (Brunell i wsp., 2010). Intensywność inwazji przekraczająca 0,5% została również uznana za wykładnik predykcyjny ciężkiej malarii przez zespół naukowców z Instytutu Chorób Tropikalnych Uniwersytetu w Bangkoku (Tangpukdee i wsp., 2012). Przeprowadzone

przez nich badania kliniczne wykazały, iż do wskaźników powikłanej malarii należała obecność schizontów i gametocytów *P. falciparum* we krwi obwodowej, długo trwająca gorączka, obniżone ciśnienie tętnicze, cechy odwodnienia, znaczna masa ciała, niskie stężenie albumin w surowicy oraz przebyta malaria w wywiadzie (Tangpukdee i wsp., 2007).

**Badania przeprowadzone w Klinice pozwoliły na opracowanie szczegółowego profilu obrazu klinicznego i powikłań wielonarządowych w przebiegu malarii rozpoznanej w szerokiej grupie pacjentów hospitalizowanych lub konsultowanych w Klinice Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu w okresie ostatnich 10 lat, w tym również u chorych przekazywanych z innych ośrodków. Jest to do chwili obecnej największe zbiorcze opracowanie kliniczne, dotyczące opisu przypadków malarii importowanej do Polski z krajów odmiennej strefy geograficzno-środowiskowej i klimatyczno-sanitarnej. Przedstawione w rozprawie cechy kliniczne i laboratoryjne zimnicy, stwierdzane u badanych pacjentów dotyczyły mieszkańców Polski nie posiadających odporności przeciwmalarycznej oraz dorosłych imigrantów z Afryki, którzy utracili częściową odporność w kierunku malarii podczas wieloletniego pobytu na obszarach nie-endemicznych.**

Na podstawie obrazu klinicznego nie można ostatecznie potwierdzić malarii, dlatego też do ustalenia rozpoznania konieczne jest zastosowanie swoistych metod diagnostycznych. Istnieje wiele metod laboratoryjnych potwierdzających malarię, lecz każda z nich posiada swoje ograniczenia. Tradycyjne badania mikroskopowe grubej kropli i cienkiego rozmazu krwi obwodowej pozostają nadal złotym standardem w rozpoznawaniu malarii. Niemniej jednak, ujemną stroną tej techniki badawczej jest dość skomplikowana procedura wykonania rozmazów, czasochłonność metody i brak odtwarzalności wyników. Ponadto, klasyczne rozmazy malaryczne gwarantują dużą czułość i swoistość metody jedynie w rękach doświadczonego parazytologa lub diagnosty laboratoryjnego, dlatego też rezultat badania jest zwykle dość subiektywny i obarczony istotnym ryzykiem otrzymania wyników zarówno fałszywie dodatnich, jaki fałszywie ujemnych. Powyższe czynniki opóźniają ustalenie ostatecznego rozpoznania i włączenie leczenia przyczynowego. Podobny wniosek wysunął Kain i współpracownicy, którzy stwierdzili, że opóźnienie w leczeniu malarii wzrastało od 5,1 do 7,6 dni i wynikało z faktu, iż lokalne laboratoria wykonujące rozmazy malarycznie

nie wykrywały aż 59% przypadków zimnicy, a u 64% pacjentów niewłaściwie rozpoznały gatunki pasożyta wywołującego zimnicę (Kain i wsp., 1998). Materiałem do badań powinna być krew włosniczkowa, a nie żylna co wynika ze zjawiska cytoadherencji i sekwestracji zarażonych erytrocytów w drobnych naczyniach włosowatych. Badanie krwi żylniej cechuje się o wiele mniejszą czułością i jest obarczone ryzykiem otrzymania wyników fałszywie ujemnych, które jest szczególnie wysokie w przypadku inwazji o małej intensywności. Wyniki fałszywie ujemne mogą być także spowodowane stosowaniem leków przeciwmalarycznych lub antybiotyków zmniejszających liczbę pasożytów, dlatego każdy wynik badania należy powtórzyć kilkakrotnie, często pobierając krew do badań na szczycie gorączki i zawsze weryfikować decyzję o wdrożeniu leczenia w oparciu o stan kliniczny pacjenta. Z drugiej strony, częściowa odporność osób wielokrotnie chorujących na malarię w przeszłości powoduje u nich brak objawów patologicznych i w takiej sytuacji o decyzji rozpoczęcia leczenia może zadecydować jedynie wynik specjalistycznych badań laboratoryjnych.

Ponieważ objawy kliniczne malarii nie są patognomiczne, a metody laboratoryjne służące potwierdzeniu zachorowania często niedostępne i niedokładne, należy dążyć do opracowania metody wykrywającej malarię, która będzie spełniała wszystkie niezbędne warunki takie jak czułość i swoistość przy krótkim czasie wykonania i niskiej cenie. Problem postawienia prawidłowej diagnozy nie dotyczy jedynie rejonów endemicznego występowania zimnicy, które nie posiadają dobrze wyposażonego zaplecza i wykształconego personelu laboratoryjnego, ale także krajów rozwiniętych, gdzie diagnozuje się rzadkie przypadki malarii importowanej z tropiku oraz nieoczekiwane, nowe przypadki wywoływane przez komary zawleczone z rejonów endemicznych oraz autochtoniczne (Cuadros i wsp., 2002; Danis i wsp., 2011; Pshenichnaya i Paul, 2011).

### **5.3. Nowe metody laboratoryjnego rozpoznawania malarii**

Do nowszych metod diagnostycznych, które mogą usprawnić diagnozowanie malarii należą: techniki fluorescencyjne, cytometria przepływowa, laboratoryjne analizatory automatyczne, metody immunodiagnostyczne i molekularne oraz spektrofotometria masowa (Tangpukdee i wsp., 2009).

Techniką stosowaną dość często w diagnostyce malarii jest metoda fluorescencyjna QBC (ang. *Quantitative Buffy Coat*), którą wprowadzono aby udoskonalić diagnostykę malarii i wspomóc standardowe badanie mikroskopowe w krajach rozwijających się. Badanie polega na wybarwieniu krwinek czerwonych zarażonych *Plasmodium* spp. oranżem akrydynowym, odwirowaniu w wirówce o wysokich obrotach i uwidocznieniu ich przy użyciu specjalistycznego mikroskopu wyposażonego w aparat umożliwiający zaobserwowanie fluorescencji oranżu akrydynowego (Chotivanich i wsp., 2006). Zasada działania powyższej metody polega na reakcji pomiędzy zastosowanym barwnikiem fluorescencyjnym, a kwasami nukleinowymi pasożyta w erytrocytach krwi obwodowej. Krwinki czerwone zawierające *Plasmodium* spp. są cięższe niż krwinki niezarażone, co powoduje rozdział erytrocytów w kapilarze podczas ich wirowania w wirówce. Technika QBC jest nie tylko metodą jakościową, potwierdzającą obecność zarodźców zimnicy w badanym materiale, ale także reakcją ilościową, która na podstawie grubości warstwy krwinek zabarwionych oranżem akrydyny, ocenia w przybliżeniu intensywność inwazji. Czułość metody QBC jest wysoka, gdyż próg wykrywalności zarodźców zimnicy wynosi 10 pasożytów w mikrolitrze krwi. Niestety swoistość metody jest niska, gdyż brak specyficzności w barwieniu kwasów nukleinowych nie pozwala na różnicowanie pomiędzy poszczególnymi gatunkami *Plasmodium* spp. Swoistość metody dodatkowo obniża fakt, że oranż akrydyny barwi nie tylko kwas nukleinowy pasożytów, ale również DNA leukocytów. Technika QBC jest metodą stosowaną w wielu rutynowych laboratoriach w krajach tropikalnych (Adeoye i Nga, 2007). Stała się ona metodą z wyboru w diagnozowaniu bezobjawowych nosicieli w rejonach endemicznego występowania malarii, szczególnie po wprowadzeniu udoskonaleń w wykrywaniu inwazji o niskiej parazytemii (Ochola i wsp., 2006). Technika ta posiada jednak pewne ograniczenia. Szerokie zastosowanie powyższej metody w ośrodkach podstawowej opieki zdrowotnej w odległych rejonach krajów rozwijających się utrudnia brak przeszkolonego personelu laboratoryjnego, konieczność wyposażenia laboratorium w mikroskop i wysokoobrotową wirówkę oraz w zużywalne barwniki i kapilary do pobierania krwi (Craig i Sharp, 1997). Pomimo, że technika jest solidna i prosta w wykonaniu, nie jest ona w pełni doskonała w ocenie gatunku i liczby pasożytów.

Technika polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR, ang. *Polymerase Chain Reaction*) służy do wykrywania swoistych sekwencji nukleotydów kwasów

nukleinowych charakterystycznych dla określonego gatunku zarodźca zimnicy. Jest ona narzędziem diagnostycznym, które cechuje się wysoką czułością i swoistością w potwierdzaniu malarii (Morassin i wsp., 2002; Erdman i Kain, 2008; Singh i wsp., 2010). W porównaniu do grubej kropli i cienkiego rozmazu krwi obwodowej, PCR wykazuje zdecydowanie wyższą czułość analityczną, gdyż próg wykrywalności zarodźców zimnicy wynosi 1-5 pasożytów w 1  $\mu$ l krwi. Reakcja PCR jest także bardziej czuła niż technika QBC i testy immunochromatograficzne, co powoduje, że stała się ona metodą referencyjną w rozpoznawaniu zimnicy o niskiej parazytemii (Rakotonirina i wsp., 2008). Jedyną trudność w interpretacji wyników badania wiąże się z brakiem możliwości różnicowania pomiędzy fragmentami DNA pochodzącymi z żywych pasożytów i tych, które zostały uszkodzone pod wpływem leków. Kolejną funkcją reakcji łańcuchowej polimerazy jest potwierdzanie obecności fragmentów pasożyta w badaniu pośmiertnym i wykrywanie mutacji genowych związanych z opornością *P. falciparum* na poszczególne leki przeciwpasożytnicze (Durrand i wsp., 2004; Bharti i wsp., 2010). W krajach, gdzie wysoka cena badania nie jest przeszkodą, technikę PCR wykorzystuje się także w badaniach skryningowych wśród dawców krwi (Hang i wsp., 1995; Benito i Rubio, 2001). Dodatkową zaletą metody jest możliwość zbadania w sposób zautomatyzowany licznych próbek krwi pochodzących od wielu pacjentów jednocześnie (Hawkes i Kain, 2007). Ze względu na fakt, iż technika polimerazowej reakcji łańcuchowej wykazuje najwyższą swoistość w potwierdzaniu poszczególnych gatunków zarodźca malarii, w tym *P. knowlesi*, stosuje się ją celem różnicowania gatunków *Plasmodium* spp. w przypadkach trudnych diagnostycznie, zwłaszcza przebiegających z niską intensywnością inwazji oraz w celu potwierdzenia inwazji mieszanych (Cox-Singh i wsp., 2008; Luchavez i wsp., 2008). Chociaż badanie PCR pokonało dwa największe problemy w rozpoznawaniu malarii, czyli czułość i swoistość diagnostyczną, użyteczność tej metody badawczej jest ograniczona przez wysoki koszt, skomplikowaną procedurę oraz konieczność zatrudnienia wykwalifikowanych pracowników do obsługi aparatury i analizy wyników badań. Te czynniki sprawiają, że PCR nie jest szeroko stosowaną metodą w odległych rejonach krajów tropikalnych (Tangpukdee i wsp., 2009).

Liczne odmiany reakcji łańcuchowej polimerazy, takie jak nested-PCR, real-time PCR, RT-PCR mogą spełniać funkcję drugiej linii diagnostycznej w przypadkach, gdy wyniki badań z użyciem metod tradycyjnych są niejednoznaczne (Rubio i wsp., 2002; Ta i wsp., 2010). Jedną z modyfikacji badania polimerazowej reakcji łańcuchowej jest

technika izotermalnej amplifikacji genowej - LAMP (ang. *Loop-Mediated Isothermal Amplification PCR*), która wykrywa gen rybosomu 18s charakterystyczny dla *P. falciparum* (Poon i wsp., 2006). Istnieją doniesienia, że opisywana metoda może również potwierdzić obecność materiału genetycznego swoistego dla *P. vivax*, *P. ovale* i *P. malariae*. Dotychczasowe obserwacje sugerują, że technika LAMP cechuje się dużą użytecznością w rutynowym skryningu osób mieszkających w rejonach endemicznego występowania zimnicy (Han i wsp., 2007; Aonuma i wsp., 2008).

Do rozpoznawania malarii wprowadza się także technikę mikromacierzy DNA, która polega na hybrydyzacji znakowanych fragmentów kwasów nukleinowych z badanej próbki z mikromacierzami DNA dołączonymi do stałej powierzchni (Cramer i wsp. 2007). Naukowcy wykorzystują mikromacierze DNA do pomiaru poziomu ekspresji dużej liczby genów jednocześnie lub genotypu wielu regionów genomu. Używana do badań sonda genetyczna zawiera określone sekwencje DNA, krótkie odcinki genu lub inny element DNA, które używa się do hybrydyzacji cDNA lub cRNA. Do określenia względnej ilości badanego kwasu nukleinowego w materiale wykorzystuje się zjawisko fluoro- lub chemiluminescencji. W ostatnich latach, skonstruowano zestawy oligonukleotydów dla wielu chorób zakaźnych, w tym również dla *P. falciparum* (Palacios i wsp., 2007). Użyteczność mikromacierzy w diagnostyce malarii wymaga jeszcze wielu, dalszych badań.

Cytometria przepływowa jest kolejną metodą diagnostyczną, która może mieć zastosowanie w potwierdzaniu obecności zarodźców malarii w ustroju człowieka, a jej zasada działania opiera się na detekcji hemozoiny zmagazynowanej w wakuoli pasożyta. Obecność hemozoiny potwierdza depolaryzacja światła lasera podczas przejścia przez kanał cytometryczny. Czułość metody waha się od 49% do 98%, a swoistość od 82% do 97% (Grobusch i wsp., 2003; Padial i wsp., 2005). Głównym zastosowaniem cytometrii przepływowej jest badanie przesiewowe osób, np. dawców krwi, u których malaria nie jest klinicznie podejrzewana.

Rozpoznanie zimnicy możliwe jest także z użyciem automatycznych analizatorów komórkowych ACC (ang. *automated blood cell counters*) (de Langen i wsp., 2006), które wykrywają hemozinę w monocytach. Czułość metody sięga 95%, a swoistość 88% w porównaniu do rozmazów krwi obwodowej (Hänscheid i wsp., 1999). Powyższe analizatory stosują także inną technikę do potwierdzenia malarii, a mianowicie ocenę stopnia depolaryzacji światła lasera z czułością sięgającą 72% i swoistością 96% (Mendelow i wsp., 1999). Kolejna nowatorska technika polega na

detekcji wzrostu aktywowanych monocytów i analizie ich objętości, przewodnictwa i rozproszenia. Czulość tej metody wynosi 98%, a swoistość 94% (Briggs i wsp., 2006).

Spektrofotometria masowa może mieć także zastosowanie w potwierdzaniu malarii w badaniach *in vitro*. Czulość analityczna metody jest porównywalna do badań molekularnych i wynosi 10 pasożytów w 1  $\mu$ l krwi. Zasada działania polega na pomiarze bezpośredniej absorbancji światła ultrafioletowego emitowanego przez laser (LDMS, ang. *direct ultraviolet laser desorption mass spectrometry*). W przypadku zimnicy wykrywanym markerem jest hem pochodzący z pigmentu *Plasmodium* - hemozoiny. LDMS jest metodą w pełni zautomatyzowaną, wydajną i bardzo szybką. W porównaniu do standardowych rozmazów krwi obwodowej, czas analizy próbki badanej przez LDMS jest krótszy niż 1 minuta (Scholl i wsp., 2004).

Powyższe metody diagnostyczne znajdują się ciągle w fazie badań, gdyż skomplikowana procedura, konieczność posiadania drogiego sprzętu laboratoryjnego i wysoce specjalistycznych odczynników, które wymagają przechowywania w lodówce oraz stałego dostępu do elektryczności powodują, że są one niepraktyczne w codziennej, rutynowej pracy laboratoryjnej i nie mogą stać się alternatywą dla tradycyjnego badania mikroskopowego krwi obwodowej.

**W celu zwiększenia możliwości rozpoznawania malarii i poprawnego oznaczenia gatunku (lub gatunków) zarodźca zimnicy, w rozprawie wykorzystano tradycyjną metodę mikroskopowego wykrywania form rozwojowych *Plasmodium* spp. w zarażonych erytrocytach, w skojarzeniu z analizą swoistych przeciwciał IgM-IgG w surowicy oraz wybranych antygenów - białka bogatego w histydynę i dehydrogenazy mleczanowej w pełnej krwi obwodowej. Zastosowanie wielokierunkowych badań parazytologicznych i immunodiagnostycznych w znacznym zakresie zwiększyło czulość analityczną wykrywania zarodźców zimnicy oraz umożliwiło ich różnicowanie i identyfikację gatunkową, niezwykle istotną przy wyborze najbardziej skutecznego postępowania terapeutycznego i ustaleniu rokowania klinicznego. Niewłaściwe rozpoznanie malarii wywołanej przez zarodźca sierpowatego, w oparciu o badanie klasycznych rozmazów krwi obwodowej, było przyczyną nawrotu zarażenia u pacjenta przedstawionego w rozprawie, nie opuszczającego terytorium Polski, gdy tymczasem test immunochromatograficzny i immunoenzymatyczny nie wykrywał obecności antygeny HRP-2 swoistego dla *P. falciparum*, a jedynie dehydrogenazę**

pLDH charakterystyczną dla zarodźca ruchliwego, odpowiedzialnego na reaktywację tej inwazji.

#### **5.4. Ocena wartości diagnostycznej testów immunochromatograficznych i immunoenzymatycznych wykrywających swoiste antygeny *Plasmodium* spp.**

Jednym z zamierzeń prowadzonych badań w ramach rozprawy doktorskiej była potrzeba znalezienia obiektywnego wykładnika laboratoryjnego malarii, który byłby zawsze obecny we krwi obwodowej u wszystkich pacjentów zarażonych *Plasmodium* spp. W przypadku tradycyjnego badania grubej kropli i cienkiego rozmazu krwi obwodowej należy brać pod uwagę fakt, że sekwestracja *P. falciparum* w mikrokrążeniu powoduje brak części form rozwojowych, takich jak dojrzałe trofozoity, czy schizonty w naczyniach obwodowych, obniżając czułość diagnostyczną tej metody badawczej. Z powodu tych niedoskonałości, coraz większe znaczenie przypisuje się wykrywaniu antygenów swoistych dla *Plasmodium* spp. jako metodzie konkurencyjnej dla klasycznej techniki mikroskopowej.

Szybkie testy immunochromatograficzne w kierunku antygenów zarodźca zimnicy (RDT, ang. *rapid diagnostic tests*) wprowadzono do diagnostyki malarii już w latach dziewięćdziesiątych XX wieku. Testy immunochromatograficzne zostały stworzone z myślą, że pozwolą na szybkie, precyzyjne i proste w obsłudze rozpoznawanie zimnicy, szczególnie w rejonach, gdzie wykonanie tradycyjnego badania mikroskopowego jest niemożliwe lub utrudnione (Singh i wsp., 2010). Potwierdził to Bell i współpracownicy, który porównywali czułość diagnostyczną standardowego badania mikroskopowego i testów immunochromatograficznych. Autorzy wykazali, że w niektórych przypadkach malarii, rozpoznanie ustalono jedynie na podstawie dodatnich wyników testów immunochromatograficznych, gdyż gruba kropla i cienki rozmaz krwi obwodowej nie wykazywały obecności form rozwojowych zarodźców zimnicy. Fałszywie ujemne wyniki badania mikroskopowego wyniknęły z niewystarczających umiejętności pracowników laboratorium i braku dostępu do dobrego sprzętu optycznego (Bell i wsp., 2001). Podobne badania przeprowadzone w ośrodkach zdrowia położonych na terenach wiejskich w Ugandzie wykazały, że czułość analityczna szybkich testów w kierunku zimnicy znacznie przewyższała wartość diagnostyczną klasycznego badania mikroskopowego krwi obwodowej



wykonywanego zarówno przez personel laboratoryjny, jak i doświadczonych ekspertów (Batwala i wsp., 2010).

Zakres czułości i swoistości diagnostycznej testów immunochromatograficznych w rozpoznawaniu malarii jest zróżnicowany w dość szerokim zakresie i zależy on od wielu czynników. Według danych Jelinka i współautorów, czułość testów immunochromatograficznych w rozpoznawaniu *P. falciparum* waha się od 35% do 97%, a swoistość osiąga wartości od 77 do 100% (Jelinek i wsp., 2001). Na dużą rozpiętość uzyskiwanych wyników badań wpływa głównie intensywność zarażenia *Plasmodium* spp. Wysoką czułość testów immunochromatograficznych powyżej 90% obserwuje się w intensywnych inwazjach przekraczających 100 - 500 pasożytów w 1  $\mu$ l krwi (Hänscheid, 1999; Moody i Chiodini, 2002; Murray i wsp., 2008; Maltha i wsp., 2011). W przypadku malarii przebiegającej z niską parazytamią, ujemny wynik testu uzyskuje się wcześniej, niż ujemne wyniki badania mikroskopowego, a przy nawrocie zimnicy dodatni wynik pojawia się zwykle później w stosunku do rozmazów malarycznych. Wysoka czułość i swoistość szybkich testów diagnostycznych dotyczy głównie wykrywania inwazji wywołanych przez zarodźca sierpowatego. W zarażeniach wywołanych przez *P. vivax* i inne gatunki poza *P. falciparum*, czułość testów może być bardzo wysoka i osiągać 97%, albo może być również skrajnie niska i lokować się na poziomie 2% (Jelinek i wsp., 2001; Rubio i wsp., 2001; Coleman i wsp., 2002; Iqbal i wsp., 2002; Mason i wsp., 2002; Playford i Walker, 2002). W rozpoznawaniu inwazji wywołanych przez *P. ovale* i *P. malariae* duże nadzieje pokładano w użyciu antygenów pan-malarycznych, swoistych dla rodzaju *Plasmodium*, ale aktualne doniesienia wskazują na niską ich użyteczność w potwierdzaniu malarii wywołanej przez oba te gatunki (Mason i wsp., 2002; Playford i Walker, 2002; Myjak i wsp., 2004). Czułość testów immunochromatograficznych w rejonach o wysokiej transmisji malarii zależy też od wieku badanej osoby i częstości występowania zarażeń wywołanych przez *P. falciparum* w danym rejonie geograficznym. Niska swoistość testów immunochromatograficznych u dzieci w wieku 5-9 lat, która wyniosła tylko 25% może doprowadzić do nadrozpoznawalności malarii w tej grupie wiekowej. Dla porównania, swoistość testów wykrywających antygen HRP-2 *P. falciparum* u dorosłych powyżej 25 lat wynosiła 73% (Chandler i wsp., 2010).

Kolejnym problemem diagnostycznym spotykanym przy stosowaniu technik immunochromatograficznych jest fakt, że aktualnie stosowane testy nie rozróżniają

inwazji mieszanych wywoływanych przez *P. falciparum* i inne gatunki *Plasmodium*, od zarażeń wywoływanych wyłącznie przez *P. falciparum* (Mason i wsp., 2002; Playford i Walker, 2002). Sytuację dodatkowo komplikuje fakt, że nazwy testów są często mylące i sugerują, że różnicują zarażenia *P. falciparum* i *P. vivax*, a faktycznie odróżniają one jedynie inwazję *P. falciparum* od innych gatunków zarodźców zimnicy (Singh i wsp., 2010). Ponadto, testy o wysokiej wartości diagnostycznej posiadają wysoką cenę i ich koszt jest zbyt wysoki dla większości lokalnych i międzynarodowych projektów, które zajmują się kontrolą i zwalczaniem malarii. Ta sytuacja powoduje, że stosowane na szeroką skalę programy walki z malarią nie mogą uczestniczyć w masowej dystrybucji drogich testów i propagowaniu tej metody diagnostycznej w rozpoznawaniu malarii w krajach rozwijających się (WHO, 2005).

Stosowanie testów immunochromatograficznych obarczone jest ryzykiem uzyskania wyników fałszywie ujemnych, które występują w zarażeniach o małym natężeniu inwazji. Czulość testów immunochromatograficznych znacznie się zmniejsza w przypadku inwazji o mniejszym natężeniu, co jest szczególnie widoczne w malarii wywołanej przez gatunki pierwotniaka inne niż *P. falciparum* (Rimon i wsp., 2003; Causer i wsp., 2005). Stąd też istnieją wymagania techniczne, aby testy immunochromatograficzne osiągały czulość diagnostyczną 95% przy intensywności inwazji 100 pasożytów w 1  $\mu$ l (Murray i Bennett, 2009). Sytuację diagnostyczną dodatkowo utrudnia zjawisko występowania wyników fałszywie ujemnych, mimo wysokich wartości parazytemii *P. falciparum* i *P. vivax* przekraczających 5000 pasożytów w 1  $\mu$ l krwi (Forney i wsp., 2001; Iqbal i wsp., 2002; Wongsrichanalai i wsp., 2007). W przypadkach malarii przebiegającej z wysoką intensywnością inwazji we krwi obwodowej, fałszywie ujemne wyniki testów immunochromatograficznych są spowodowane efektem „prozony”, wynikającym z nadmiaru niezwiązanego przez przeciwciała antygeny, ale w takich przypadkach wykrycie zarażenia *Plasmodium* spp. nie powinno sprawiać żadnych trudności przy użyciu standardowego badania mikroskopowego (Gillet i wsp., 2011; Luchavez i wsp., 2011). Stąd też testy immunochromatograficzne nie powinny być stosowane jako jedyna metoda diagnostyczna dla rozpoznawania malarii.

Wyniki fałszywie dodatnie uzyskuje się natomiast w przypadku reakcji krzyżowych pomiędzy antygenami zarodźców i innych pierwotniaków krwi. Znana jest także reaktywność krzyżowa antygenów *Plasmodium* spp. z czynnikiem reumatoidalnym lub przeciwciałami heterofilnymi, która powoduje otrzymanie wyników fałszywie

dotadnich (Wongsrichanalai i wsp., 2007). Zależność tą potwierdza Craig i współpracownicy, którzy analizowali różne rodzaje testów immunochromatograficznych i zauważyli, że reakcje krzyżowe między antygenami pasożytów, a czynnikiem reumatoidalnym występowały u 5-30% badanych pacjentów. Autorzy nie zdołali ustalić co było czynnikiem, który zwiększał prawdopodobieństwo wystąpienia reakcji krzyżowej (Craig i wsp., 2002). Fałszywie dodatnie wyniki dla dehydrogenazy mleczanowej swoistej dla *P. vivax* obserwowano również w izolowanych inwazjach *P. falciparum* przebiegających z wysoką parazytemią  $\geq 2\%$ , ale w takich przypadkach badanie mikroskopowe nie stwarza żadnych problemów diagnostycznych (Maltha i wsp., 2010).

**Badania dotyczące testów immunochromatograficznych wykazały większą wartość użycia tej metody diagnostycznej poza rejonem endemicznego występowania zimnicy, gdyż u osób, które importowały malarię z krajów strefy międzyzwrotnikowej i subtropikalnej do Polski i Europy rozpoznaje się zdecydowanie wyższą parazytemię *Plasmodium* spp. we krwi obwodowej niż u osób mieszkających w tropiku na stałe. Powodem zaistniałej sytuacji było również opóźnienie w kierowaniu do specjalistycznego ośrodka i bardziej zaawansowana faza choroby oraz brak częściowej odporności przeciwmalarycznej u większości badanych pacjentów.**

Wieloośrodkowe badania kliniczne przeprowadzone przez Palmera i współpracowników na terenie dużych szpitali w Stanach Zjednoczonych wykazały bardzo znaczną przydatność testu immunochromatograficznego w rozpoznawaniu malarii u osób gorączkujących zgłaszających się do izby przyjęć i oddziałów ratunkowych na obszarze nie-endemicznym, z uzyskaną czułością diagnostyczną metody osiagającą 98%, przy swoistości równej 100% (Palmer i wsp., 2003). Z kolei w Wielkiej Brytanii, szybkie testy diagnostyczne przyczyniły się do zmiany rozpoznań parazytologicznych ustalonych na podstawie oceny klasycznych rozmazów krwi obwodowej w 12% laboratoriów (Chilton i wsp., 2006). Podobnie, w innych laboratoriach europejskich, aż 94% diagnostów stosuje testy immunochromatograficzne jako uzupełniającą metodę diagnostyczną do tradycyjnego badania mikroskopowego (Gillet i wsp., 2010). W odniesieniu do techniki łańcuchowej polimerazy, szybkie testy immunochromatograficzne pozwoliły na identyfikację aż 97% przypadków malarii u amerykańskich turystów powracających z gorączką z obszarów tropikalnych, w porównaniu do 85% inwazji rozpoznanych klasyczną

techniką mikroskopową (Wilson, 2012). Mimo iż procedura testów immunochromatograficznych opiera się na technice jakościowej, na podstawie stopnia wysycenia obserwowanych prążków można w przybliżeniu określić również intensywności inwazji *Plasmodium* spp. (Katakai i wsp., 2011).

Szerokie stosowanie techniki immunochromatograficznej i uznanie jej za metodę referencyjną w rozpoznawaniu malarii, wymagałoby ustalenia warunków określających złoty standard w zakresie wykonywania i analizowania tych testów. Aktualne badania z użyciem testów immunochromatograficznych wykazują, że w różnych regionach świata występują różne gatunki i szczepy zarodźców, które wymagają stosowania testów immunochromatograficznych w kierunku odmiennych antygenów oraz, że testy różnią się od siebie w sposobie wykonywania, oceniania wyników i przechowywania, w zależności od zaleceń producentów. Powyższe różnice utrudniają znalezienie jedyne go testu uznawanego za złoty standard i ograniczają możliwość porównywania testów np. w zakresie ich czułości diagnostycznej (Hänscheid, 1999). Badania przeprowadzone przez ekspertów Światowej Organizacji Zdrowia wykazały, iż tylko nieliczne spośród ponad 100 rodzajów testów immunochromatograficznych, obecnych aktualnie na rynku i szeroko stosowanych zarówno w krajach tropikalnych jak i na obszarach nie-endemicznych, spełniają wymagane kryteria diagnostyczne (Murray i wsp., 2008; WHO, 2011b). Szybkie testy do rozpoznawania antygenów zimnicy są zalecane w krajach tropikalnych, jako uzupełnienie diagnozy klinicznej u osób gorączkujących w przypadku braku możliwości wykonania lub niepowodzenia badania mikroskopowego, a także w sytuacjach przekraczających możliwości jego technicznego wykonania, jak np. podczas epidemii malarii wśród uchodźców oraz w populacji bezobjawowej narażonej na zachorowanie (Tjitra i wsp., 1999; Coleman i wsp., 2002; Williams i wsp., 2008; Hawkes i wsp., 2009; Ansah i wsp., 2010; Chandler i wsp., 2010; Kyabayinze i wsp., 2010; Portero i wsp., 2010).

Wyniki testów immunochromatograficznych mogą być także modyfikowane przez różne czynniki zewnętrzne. Mimo, iż testy aktualnie wykorzystywane w diagnostyce zimnicy nie wymagają przechowywania w lodówce i wytrzymują temperaturę w zakresie od 2 do 30°C, istnieją doniesienia, że temperatura i wilgotność otoczenia, sposób przechowywania oraz czas ważności mogą wpłynąć na funkcjonowanie testów i uzyskiwane wyniki badań (Craig i wsp., 2002; Guthmann i wsp., 2002; Moody i Chiodini, 2002; Chiodini i wsp., 2007; Murray i wsp., 2008; Mikhail i wsp., 2011).

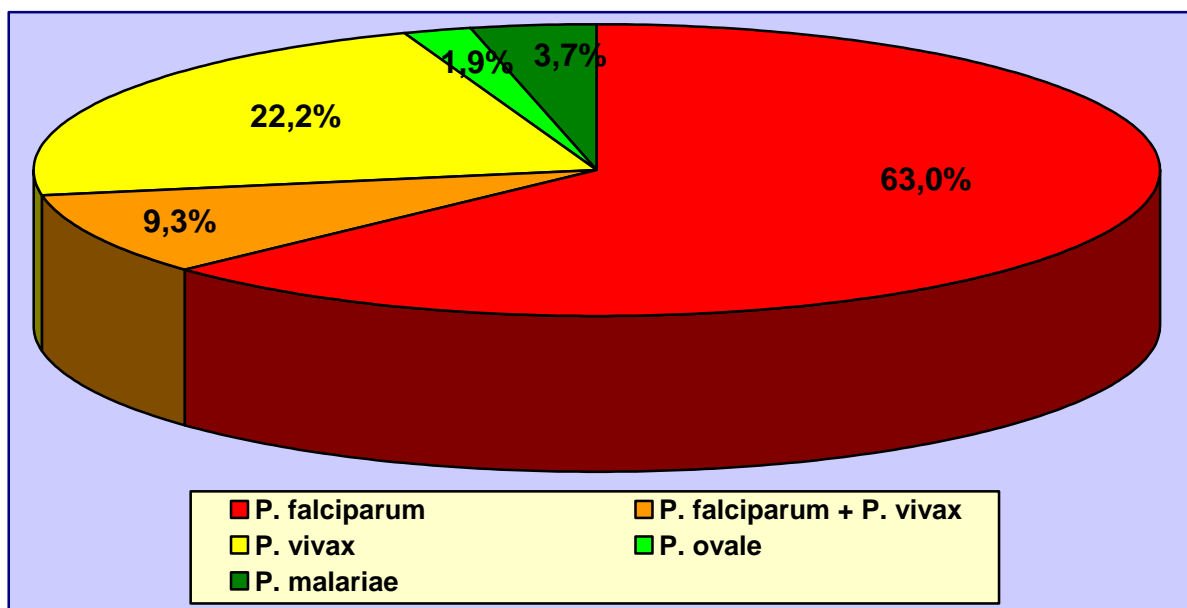
Jednym z kluczowych założeń przy konstruowaniu testów immunochromatograficznych, było stworzenie metody diagnostycznej, która byłaby nieskomplikowana w wykonaniu, tak aby każda osoba, która posiadałaby instrukcję obsługi mogła wykonać test prawidłowo. W badaniach przeprowadzonych przez Jelinka i współpracowników okazało się, że aż 9-32% turystów nie potrafiło poprawnie wykonać testu (Jelinek i wsp., 2001; Jelinek, 2004). Potwierdził to Bell, który zauważył, że prawidłowe wykonanie testu było zagwarantowane poprzez uprzednie szkolenie i dotyczyło grupy położnych i wolontariuszy pracujących w instytucjach ochrony zdrowia (Bell i wsp., 2001).

Obecność swoistych antygenów *Plasmodium* spp. można również wykryć we krwi obwodowej za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA. Zespół naukowców z Uniwersytetu w Bangkoku wykazał, iż czułość analityczna tej techniki immunodiagnostycznej w istotny sposób przewyższała wartość diagnostyczną tradycyjnej analizy mikroskopowej rozmazów krwi. Zastosowanie skojarzonej metody oznaczania antygeny HRP-2 z klasycznym badaniem mikroskopowym w ośrodkach tropikalnych, zlokalizowanych na terenach przygranicznych Tajlandii i Birmy (Myanmar), pozwoliło na osiągnięcie wysokiej czułości diagnostycznej wykrywania malarii na poziomie porównywalnym do technik biologii molekularnej (Noedl i wsp., 2006).

Antygen HRP-2 produkowany jest przez wszystkie bezpłciowe formy rozwojowe zarodźca sierpowatego oraz przez młode gametocyty. Antygen występuje w postaci wolnej, związanej z przeciwciałami w surowicy, w zarażonych krwinkach czerwonych, przyłączony do zdrowych erytrocytów za pomocą receptorów dopełniacza jako część kompleksów immunologicznych oraz do leukocytów. Każda z postaci ma inną kinetykę przemian i różny okres półtrwania w badanej krwi. Dlatego też, poziom antygeny w momencie wykonywania badania, nie musi korelować z aktualnym natężeniem inwazji i nie świadczy o dokładnej liczbie pasożytów we krwi obwodowej. Istotne jest, aby osobno interpretować ilość antygeny i jego wpływ na przebieg kliniczny i rokowanie w malarii. Bezpośrednia zależność pomiędzy produkcją antygeny HRP-2 i liczbą pasożytów oraz stadium ich rozwoju występuje jedynie w badaniach *in vitro* (Murray i wsp., 2008; Pava i wsp., 2010).

Wynik testu immunoenzymatycznego ELISA nie ocenia dokładnej ilości antygeny, gdyż jedna cząsteczka antygeny posiada wiele epitopów (najczęściej od 1 do 10) do przyłączenia przeciwciał detektorowych, co od razu obniża sygnał w

spektrofotometrze. Stosunek antygen - przeciwciało 1:1 występuje jedynie w przypadku aldolazy i dehydrogenazy mleczanowej *Plasmodium* spp. Ponadto u osób, które przechorowały malarię w przeszłości i posiadają częściową odporność przeciwmalaryczną, naturalne przeciwciała skierowane przeciwko antygenowi HRP-2 muszą konkurować o przyłączenie antygeny, z zastosowanymi w teście ELISA przeciwciałami wiążącymi i wykrywającymi.



Ryc. 55. Ostateczne rozpoznanie malarii u pacjentów hospitalizowanych i konsultowanych w Klinice, ustalone na podstawie skojarzonego zastosowania badania mikroskopowego oraz oznaczania swoistych antygenów *Plasmodium* spp. we krwi obwodowej (n=54).

Badania przeprowadzone w Klinice w ramach rozprawy doktorskiej wykazały, że skojarzone zastosowanie zarówno szybkiego testu immunochromatograficznego wykrywającego antygen HRP-2 *P. falciparum* oraz nieswoistą gatunkowo dehydrogenazę *Plasmodium* spp., jak i techniki immunoenzymatycznej ELISA dla wykrywania białka HRP-2, przyczyniło się do ustalenia poprawnego rozpoznania kilku trudnych diagnostycznie przypadków malarii, których wykrycie tradycyjną techniką mikroskopową było niepewne lub **dyskusyjne**. U jednego pacjenta, u którego rozpoznano wstępnie inwazję wywołaną przez zarodźca sierpowatego, o niewielkiej intensywności zarażenia, technika immunochromatograficzna pozwoliła na weryfikację diagnostyki mikroskopowej i

postawienia ostatecznego rozpoznania izolowanej inwazji *P. vivax*, co zostało dodatkowo udokumentowane pojawieniem się klinicznego nawrotu zarażenia po upływie 3 miesięcy od leczenia ostrego epizodu zimnicy oraz brakiem obecności białka HRP-2 w teście immunoenzymatycznym ELISA. Z kolei u dwóch kolejnych pacjentów z rozpoznaną mikroskopowo inwazją mieszaną, brak obecności antygeny HRP-2 w teście immunochromatograficznym i technice immunoenzymatycznej ELISA, przyczynił się do obiektywnej weryfikacji rozpoznania parazytologicznego i ustalenia ostatecznego rozpoznania izolowanej inwazji odpowiednio *P. malariae* lub *P. vivax*, bez współistniejącego zarażenia *P. falciparum*. **Uzyskane wyniki badań pozwoliły na potwierdzenie wysokiej użyteczności metod wykrywających swoiste antygeny *Plasmodium* spp. we krwi obwodowej, jako uzupełniających technik diagnostycznych stosowanych w skojarzeniu z klasycznym badaniem mikroskopowym. Zastosowanie tych metod okazało się szczególnie przydatne, zwłaszcza w trudnych przypadkach przebiegających z niską intensywnością inwazji lub podejrzanych o inwazję mieszaną. Testy wykrywające swoiste antygeny *Plasmodium* spp. we krwi obwodowej, wykazywały najwyższą czułość diagnostyczną dla rozpoznawania i różnicowania malarii wywołanej przez *P. falciparum* i *P. vivax* oraz potwierdziły wszystkie przypadki malarii mieszanej wywołanej jednocześnie przez *P. falciparum* i *P. vivax*. Jedyne w przypadku izolowanych inwazji powodowanych przez *P. ovale* i *P. malariae*, udokumentowano wyższą wartość diagnostyczną klasycznej analizy mikroskopowej nad badaniami immunodiagnostycznymi w kierunku antygenów zarodźca zimnicy. Ostateczne rozpoznanie malarii u pacjentów hospitalizowanych i konsultowanych w Klinice, ustalone na podstawie skojarzonego zastosowania klasycznego badania mikroskopowego oraz oznaczenia białka bogatego w histydynę *P. falciparum* i nieswoistej gatunkowo dehydrogenazy mleczanowej zarodźca zimnicy we krwi obwodowej przedstawia Rycina 55. W okresie objętym prowadzeniem badań w ramach rozprawy doktorskiej, nie notowano w Klinice przypadków zimnicy wywołanych przez *P. knowlesi*.**

## **5.5. Ocena wartości klinicznej i prognostycznej testów immunodiagnostycznych wykrywających swoiste antygeny *Plasmodium* spp.**

W rozprawie doktorskiej podjęto się próby wykorzystania oznaczeń białka bogatego w histydynę specyficznego dla zarodźca sierpowatego oraz nieswoistej gatunkowo dehydrogenazy mleczanowej *Plasmodium* spp. dla oceny przebiegu klinicznego choroby oraz ustalenia rokowania u pacjentów z ostrym epizodem malarii. Przeprowadzone w Klinice badania wykazały, że profil wykrywanych antygenów *Plasmodium* spp. był znacznie zróżnicowany w zależności od charakteru i stopnia nasilenia objawów klinicznych. Niezależnie od zastosowanej metody immunodiagnostycznej, antygen HRP-2 *P. falciparum* był wykrywany w powikłanych przypadkach zimnicy zakończonych zgonem, które były hospitalizowane w oddziałach chorób zakaźnych oraz u większości pacjentów z malarią o przebiegu ciężkim oraz bardzo ciężkim. U pacjentów z malarią niepowikłaną, białko bogate w histydynę wykrywano znacznie rzadziej, niż w pozostałych grupach pacjentów zarażonych *Plasmodium* spp. Stąd też obecność antygeny HRP-2 we krwi obwodowej może być wartościowym i praktycznym wykładnikiem ciężkiej malarii o niekorzystnym rokowaniu klinicznym, stosowanym w codziennej praktyce lekarskiej w oddziałach chorób tropikalnych.

Ponadto, istniała pozytywna korelacja poziomów białka bogatego w histydynę w zakresie oceny stopnia ciężkości przebiegu klinicznego zimnicy, czasu zgłoszenia się do szpitala, długości hospitalizacji i utrzymywania się stanów gorączkowych u badanych pacjentów. U chorych z powikłaną malarią, którzy prezentowali objawy niewydolności nerek, układu oddechowego, cechy skazy krwotocznej z zespołem wykrzepiania wewnątrznaczyniowego, czy objawy malarii mózgowej, poziom antygeny HRP-2 *P. falciparum* był istotnie wyższy, niż u osób nie posiadających powyższych zaburzeń.

Analizując parazytologiczne wykładniki powikłanej malarii wywołanej przez zarodźca sierpowatego, takie jak obecność wysokiej lub krytycznej parazytemii we krwi obwodowej i/lub schizontów *P. falciparum* w erytrocytach oraz złogów hemozoiny w leukocytach wykazano, iż pacjenci, u których wykrywano co najmniej jeden laboratoryjny marker malarii o niekorzystnym znaczeniu prognostycznym w rozmazach krwi obwodowej, posiadali zdecydowanie wyższy poziom antygeny



HRP-2 *P. falciparum* niż osoby, u których nie stwierdzano cech parazytologicznych ciężkiej zimnicy. Przeprowadzone w Klinice badania wykazały istotną korelację wysokich poziomów białka HRP-2 we krwi obwodowej nie tylko z klinicznymi i laboratoryjnymi wykładnikami niewydolności wielonarządowej o niepewnym rokowaniu klinicznym, ale również z parazytologicznymi wskaźnikami ciężkiej, powikłanej malarii, ustalonymi przez Światową Organizację Zdrowia.

Określenie antygenów *Plasmodium* spp. przy użyciu testów immunochromatograficznych i technik immunoenzymatycznych może mieć różne zastosowanie w diagnostyce zimnicy. Antygen HRP-2 potwierdza zarażenie *P. falciparum*, ale według niektórych doniesień nie może być on wykorzystywany jako marker skuteczności leczenia przeciwmalarycznego, gdyż utrzymuje się w krążeniu pacjenta jeszcze przez kilka tygodni po zakończeniu skutecznej terapii (Kyabayinze i wsp., 2008; Kattenberg i wsp., 2012). Funkcję wyznacznika aktywności *P. falciparum* i innych gatunków zarodźców przypisuje się natomiast dehydrogenazie mleczanowej, której poziom gwałtownie obniża się wraz ze zmniejszaniem się parazytemii we krwi obwodowej. Warunkiem użyteczności tego enzymu w ocenie żywotności *Plasmodium* spp., która przekłada się na skuteczność leczenia jest liczba gametocytów mniejsza niż 100 w 1  $\mu$ l lub ich całkowity brak w analizowanej krwi (Murray i Bennett, 2009).

W badaniach przeprowadzonych w Klinice, antygen HRP-2 *P. falciparum* był wykrywalny we krwi obwodowej badanych pacjentów po ukończeniu celowanego leczenia z taką samą częstością, jak nieswoista gatunkowo dehydrogenaza mleczanowa *Plasmodium* spp. U żadnego z badanych pacjentów nie obserwowano również gametocytów we krwi obwodowej w dniu wypisu ze szpitala. Wykazano natomiast, że antygeny zarodźca zimnicy były częściej obecne we krwi obwodowej po zakończeniu leczenia przeciwpasożytniczego u pacjentów z powikłaną malarią o przebiegu ciężkim i bardzo ciężkim niż w przypadkach łagodnych. W inwazjach, w których jednym z rozpoznawanych gatunków był zarodziec sierpowaty (*P. falciparum* i inwazje mieszane), stężenia białka HRP-2 po leczeniu były ujemne (73,7%) lub zdecydowanie niższe (26,3%) niż w dniu przyjęcia do szpitala, świadcząc o skuteczności prowadzonej terapii przeciwpasożytniczej (patrz podrozdział 4.5.4.).

## 6. WNIOSKI

1. Przeprowadzone w Klinice badania wykazały, że malaria jest częstą przyczyną stanów gorączkowych wymagających specjalistycznej diagnostyki różnicowej u polskich turystów i misjonarzy, powracających do Polski z endemicznych obszarów strefy międzyzwrotnikowej i subtropikalnej.
2. U pacjentów leczonych i konsultowanych w Ośrodku Poznańskim potwierdzono korelację ciężkiego obrazu klinicznego malarii z brakiem przedwyjazdowej konsultacji medycznej u specjalisty chorób tropikalnych, niestosowaniem właściwej farmakologicznej profilaktyki przeciwmalarycznej oraz odbyciem podróży o charakterze zawodowym do krajów Afryki Równikowej i dłuższym okresie pobytu przekraczającym 2 tygodnie.
3. Wykrywanie antygenów *Plasmodium* spp. we krwi obwodowej okazało się cenną, uzupełniającą metodą diagnostyczną dla rozpoznawania malarii, importowanej z obszarów odmiennej strefy klimatyczno-sanitarnej, przebiegającej z niską intensywnością inwazji lub wywoływanej przez kilka gatunków zarodźca zimnicy, która sprawia trudności w tradycyjnym badaniu mikroskopowym.
4. Oznaczanie poziomu antygeny HRP-2 *P. falciparum* we krwi obwodowej posiada istotną wartość kliniczną i prognostyczną dla oceny stopnia ciężkości przebiegu klinicznego malarii, określenia ryzyka niewydolności wielonarządowej oraz monitorowania skuteczności leczenia przeciwpasożytniczego.

## 7. STRESZCZENIE

**Wprowadzenie:** W ostatnich latach, obserwuje się znaczące nasilenie ruchu turystycznego oraz wyjazdów służbowych do krajów strefy międzyzwrotnikowej i subtropikalnej, stwarzające istotne ryzyko importowania do Polski wielu chorób egzotycznych. Malaria stanowi jedną z głównych przyczyn stanów gorączkowych oraz ciężkich powikłań wielonarządowych wśród osób podróżujących do obszarów endemicznych. U osób powracających z tropiku i nie posiadających częściowej odporności przeciwmalarycznej, zimnica jest stanem bezpośredniego zagrożenia życia, a jej niewłaściwe lub opóźnione rozpoznanie i leczenie stwarzają istotne ryzyko niekorzystnego rokowania klinicznego, z uwzględnieniem zgonu.

**Cele pracy:** (1) Określenie częstości występowania malarii wśród pacjentów gorączkujących po powrocie z obszarów endemicznych, hospitalizowanych w Klinice Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu; (2) Ocena przebiegu klinicznego malarii u osób podróżujących do rejonów odmiennej strefy klimatyczno-środowiskowej i sanitarno-higienicznej, leczonych i konsultowanych w Ośrodku Poznańskim; (3) Określenie wartości diagnostycznej metod wykrywających antygeny zarodźca zimnicy we krwi obwodowej dla rozpoznawania malarii u polskich pacjentów powracających z krajów endemicznych strefy gorącej; oraz (4) Analiza możliwości wykorzystania oznaczeń antygenów *Plasmodium* spp. we krwi obwodowej dla oceny klinicznej i prognostycznej pacjentów z malarią, importowaną do kraju z obszarów tropikalnych i subtropikalnych.

**Materiał i metody:** Badania epidemiologiczno-kliniczne oraz laboratoryjne przeprowadzono u 47 pacjentów (wiek 22-59 lat, średnia 39,0 lat) z ostrym epizodem malarii, którzy w okresie od stycznia 2001 roku do października 2012 roku zostali przyjęci do Kliniki Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (n=44) lub też byli hospitalizowani w oddziałach chorób zakaźnych południowej Polski z powodu zagrażających życiu objawów klinicznych, u których ostateczne potwierdzenie rozpoznania przeprowadzono w Klinice (n=3). W grupie badanej było 42 Polaków (89,4%) oraz 5 imigrantów z Afryki (10,6%). Czterech pacjentów było wielokrotnie hospitalizowanych w Klinice z powodu nawrotów malarii (8,5%): u trzech osób stwierdzono dwukrotną reaktywację zarażenia *P. vivax*, a w jednym przypadku – jednokrotną, stąd też łącznie w okresie objętym badaniami klinicznymi w Ośrodku Poznańskim hospitalizowano lub konsultowano 54 przypadki ostrych epizodów zimnicy. Grupę kontrolną stanowiło 50 polskich misjonarzy, powracających do kraju po długotrwałym pobycie w krajach strefy gorącej lub subtropikalnej. Wywiad epidemiologiczny, obejmujący charakter i cel podróży tropikalnej oraz długość i miejsce pobytu, z uwzględnieniem czynników ryzyka zarażenia, został przeprowadzony w oparciu o ujednoczony kwestionariusz pytań. Ocenę stanu klinicznego pacjentów z malarią dokonywano na podstawie aktualnych kryteriów Światowej Organizacji Zdrowia. U wszystkich

pacjentów przeprowadzono parazytologiczne badania mikroskopowe w kierunku obecności form rozwojowych *Plasmodium* spp. w połączeniu z jakościowymi testami immunochromatograficznymi wykrywającymi białko bogate w histydynę (HRP-2) charakterystyczne dla *P. falciparum* oraz nieswoistą gatunkowo dehydrogenazę mleczanową (pLDH) *Plasmodium* spp. (DRG International Inc., New Jersey, USA) oraz oznaczeniem stężenia antygenu HRP-2 we krwi obwodowej za pomocą techniki immunoenzymatycznej ELISA (Cellabs, Brookvale, Australia).

**Wyniki:** Spośród 47 pacjentów hospitalizowanych lub konsultowanych w Klinice z potwierdzeniem malarii, większość osób (83,0%) zaraziło się zarodźcem zimnicy podczas pobytu w Afryce Subsaharyjskiej, przede wszystkim w Kamerunie, Ghanie i Nigerii. Głównym celem podróży pacjentów tworzących grupę badaną była podróż służbowa (51,1%), zwłaszcza wyjazd do pracy w ośrodkach misyjnych i placówkach humanitarnych w tropiku (27,7%). Pacjenci grupy badanej przebywali w krajach endemicznego występowania malarii przez okres 1 tygodnia - 56 lat (średnio 207 tygodni); zdecydowana większość osób podróżowała w tropiku przez okres dłuższy niż 2 tygodnie (78,7%). Tylko 13,0% pacjentów skorzystało z profesjonalnej konsultacji u lekarza specjalisty chorób tropikalnych lub medycyny podróży przed planowanym wyjazdem do krajów strefy gorącej. Ponad połowa pacjentów z malarią rozpoznaną w Ośrodku Poznańskim nie stosowała żadnej farmakologicznej profilaktyki przeciwmalarycznej (51,1%), 1/3 osób przyjmowała leki nieskuteczne dla danego rejonu geograficznego świata (29,8%), a 12,7% badanych pobierało leki niezgodnie z zaleceniami lekarza.

Spośród 54 przypadków ostrych epizodów malarii hospitalizowanych lub konsultowanych w Ośrodku Poznańskim, u 37 pacjentów zaobserwowano niepowikłany przebieg zimnicy (68,5%), u 8 osób przebieg ciężki (14,8%), a u 7 chorych bardzo ciężki (13,0%). Dwóch pacjentów z wielonarządowymi powikłaniami w przebiegu malarii hospitalizowanych w innych ośrodkach w Polsce zmarło (3,7%). Do najczęściej występujących objawów klinicznych należała wysoka gorączka poprzedzona dreszczami (100%), hepatosplenomegalia (60,0%), zaburzenia świadomości (22,2%), żółtaczką (22,2%), niewydolność nerek (22,2%), zaburzenia oddychania (16,7%), cechy skazy krwotocznej (7,4%), rzadziej kwasica metaboliczna (13,0%), niewydolność wątroby (3,7%), czy zapaść naczyniowa (1,9%); u 14 chorych zaobserwowano cechy niewydolności wielonarządowej (25,9%).

Na podstawie analizy mikroskopowej preparatów grubej kropli i cienkiego rozmazu krwi obwodowej barwionych metodą Giemsy, izolowane zarażenie *P. falciparum* stwierdzono u 64,8% badanych, inwazję *P. vivax* rozpoznano w 20,4% przypadkach, zarażenia wywołane przez *P. ovale* lub *P. malariae* wykryto u 3,7% badanych, natomiast inwazje mieszane stanowiły 11,1% wszystkich rozpoznań mikroskopowych.

Dodatni wynik testu immunochromatograficznego w kierunku obecności zarówno antygenu HRP-2 *P. falciparum*, jak i dehydrogenazy mleczanowej swoistej dla *Plasmodium* spp. stwierdzono w dniu przyjęcia do szpitala u połowy badanych pacjentów. Białko bogate w histydynę występowało samodzielnie w 18,5% przypadków malarii, natomiast obecność pLDH *Plasmodium* spp., jako jedyne wykrywanego antygenu, zaobserwowano u 27,8% badanych. Wśród 54 przypadków ostrej malarii rozpoznanych w Klinice, wartości gęstości optycznej reakcji immunoenzymatycznej ELISA dla antygenu HRP-2 *P. falciparum* wahały się od 0,051 do 1,226 (średnia  $0,623 \pm 0,494$ ). Obecność białka bogatego w histydynę potwierdzono u 61,1% badanych pacjentów, co stanowiło 88,6% zachorowań z rozpoznaną mikroskopowo inwazją *P. falciparum* oraz 80,5% zarażeń, w których jednym z wykrywanych gatunków był zarodek sierpowaty. U żadnego z 50 misjonarzy grupy kontrolnej nie stwierdzono obecności form rozwojowych, ani swoistych antygenów charakterystycznych dla zarodźca zimnicy we krwi obwodowej.

U chorych z malarią powikłaną, którzy prezentowali objawy niewydolności nerek lub układu oddechowego, cechy skazy krwotocznej z zespołem wykrzepiania wewnątrznaczyniowego, czy też zaburzenia świadomości z objawami malarii mózgowej, średnie poziomy antygenu HRP-2 *P. falciparum* okazały się statystycznie zdecydowanie wyższe, niż u osób nie posiadających powyższych powikłań narządowych. Analizując parazytologiczne wykładniki ciężkiej malarii wywołanej przez *P. falciparum*, takie jak wysoka lub krytyczna parazytemia, obecność schizontów *P. falciparum* w erytrocytach oraz złogów hemozoiny w leukocytach wykazano, iż pacjenci, u których wykrywano co najmniej jeden laboratoryjny marker malarii o niekorzystnym znaczeniu prognostycznym w rozmazach krwi obwodowej, posiadali statystycznie istotnie wyższe średnie wartości antygenu HRP-2 *P. falciparum* niż osoby, u których nie stwierdzano cech mikroskopowych powikłanej zimnicy. W rozprawie wykazano, iż swoiste antygeny zarodźca zimnicy były częściej obecne we krwi obwodowej po zakończeniu leczenia przeciwpasożytniczego u pacjentów z powikłaną malarią o przebiegu ciężkim i bardzo ciężkim, niż w postaciach o przebiegu łagodnym.

**Wnioski:** (1) Przeprowadzone w Klinice badania wykazały, że malaria jest częstą przyczyną stanów gorączkowych wymagających specjalistycznej diagnostyki różnicowej u polskich turystów i misjonarzy, powracających do Polski z endemicznych obszarów strefy międzyzwrotnikowej i subtropikalnej; (2) U pacjentów leczonych i konsultowanych w Ośrodku Poznańskim potwierdzono korelację ciężkiego obrazu klinicznego malarii z brakiem przedwyjazdowej konsultacji medycznej u specjalisty chorób tropikalnych, niestosowaniem właściwej farmakologicznej profilaktyki przeciwmalarycznej oraz odbyciem podróży o charakterze zawodowym do krajów Afryki Równikowej i dłuższym okresie pobytu przekraczającym 2 tygodnie; (3) Wykrywanie antygenów *Plasmodium* spp. we krwi obwodowej okazało się cenną, uzupełniającą metodą diagnostyczną dla rozpoznawania

malarii, importowanej z obszarów odmiennej strefy klimatyczno-sanitarnej, przebiegającej z niską intensywnością inwazji lub wywoływanej przez kilka gatunków zarodźca zimnicy, która sprawia trudności w tradycyjnym badaniu mikroskopowym; (4) Oznaczenie poziomu antygenu HRP-2 *P. falciparum* we krwi obwodowej posiada istotną wartość kliniczną i prognostyczną dla oceny stopnia ciężkości przebiegu klinicznego malarii, określenia ryzyka niewydolności wielonarządowej oraz monitorowania skuteczności leczenia przeciwpasożytniczego.

**Słowa kluczowe:** malaria, *Plasmodium* spp., medycyna tropikalna, swoiste antygeny, HRP-2, pLDH, przebieg kliniczny, rokowanie, leczenie.

## 8. SUMMARY

**Detection of *Plasmodium* spp. specific antigens in the peripheral blood, for the diagnosis, evaluation of the clinical status and treatment efficacy in patients with malaria imported to Poland from tropical and subtropical areas.**

**Introduction:** In recent years, there has been a significant increase in the number of tourist and business travels to tropical and subtropical countries, thereby causing a significant risk of importing many exotic diseases into Poland. Malaria is one of the main causes of fever and severe multi-organ complications among travellers to endemic areas. For people returning from the tropics and who do not have anti-malarial semi-immunity, malaria constitutes an immediate threat to their life and its improper or delayed diagnosis or treatment poses a significant risk of adverse clinical outcomes, including death.

**Objectives of the study:** (1) Determination of the incidence of malaria in patients with fever, hospitalised at the Department and Clinic of Tropical and Parasitic Diseases, University of Medical Sciences in Poznan, after returning from malaria endemic areas; (2) Evaluation of the clinical course of malaria in travellers to tropical or subtropical regions, treated at the Poznań Centre; (3) Determination of the diagnostic value of the methods used for the detection of *Plasmodium* spp. – specific antigens in the peripheral blood, for the diagnosis of malaria in Polish patients returning from endemic countries; and (4) Analysis of the possibilities of using the detection of specific *Plasmodium* spp. antigens in the peripheral blood for the clinical and prognostic evaluation of patients with malaria, imported into the country from tropical and subtropical regions.

**Materials and methods:** Epidemiological, clinical and laboratory studies were carried out on 47 patients (aged 22-59 years, mean 39 years) with an acute episode of malaria, who during the period from January 2001 to October 2012, were admitted to the Department and Clinic of Tropical and Parasitic Diseases, University of Medical Sciences in Poznań (n=44) or who were hospitalised at departments of infectious diseases in southern Poland due to immediate life-threatening clinical conditions, the final confirmation of diagnosis of which was performed in the Clinic (n=3). The group investigated consisted of 42 Polish patients (89.4%) and 5 immigrants from Africa (10.6%). Four of the patients were repeatedly hospitalised in the Department because of recurrences of malaria (8.5%). The reactivation of *P. vivax* infection was observed in three patients and once in one case – therefore, a total of 54 cases of acute episodes of malaria were hospitalised or consulted at the Poznań Centre during the period covered by the clinical study. The control group consisted of 50 Polish missionaries, returning to the country after a long stay in tropical or subtropical countries. An epidemiological interview, covering the nature and reason for the trip, as well as the length and place of stay, taking risk factors of infection into account, was performed based on a

standardised questionnaire. Evaluation of the clinical status of malaria patients was carried out based on the current World Health Organization criteria. Parasitological microscopic examinations for the presence of developmental forms of *Plasmodium spp.* in conjunction with qualitative immunochromatographic tests for the detection of histidine-rich protein (HRP-2) characteristic of *P. falciparum* and non-specific *Plasmodium* lactate dehydrogenase (pLDH) (*DRG International Inc.*, New Jersey, USA) test as well as the determination of the concentration of HRP-2 in the peripheral blood using the immunoenzymatic ELISA (*Cellabs*, Brookvale, Australia) were performed in all the patients.

**Results:** Of the 47 patients with malaria who were hospitalised or consulted at the Department, most of them (83.0%) were infected with *Plasmodium spp.* during their stay in sub-Saharan Africa, especially in the Cameroon, Ghana and Nigeria. The main purpose of the patients' travel was business trip (51.1%), mainly to work in missionary centres and humanitarian institutions in the tropics (27.7%). Patients from the study group stayed in malaria-endemic countries for a period of one week to 56 years (average of 207 weeks); the vast majority of people travelled around in the tropics for more than 2 weeks (97.9%). Only 13.0% of the patients benefited from professional consultation with tropical diseases or travel medicine specialists before the planned trip to tropical areas. More than half of the patients diagnosed with malaria at the Poznań Centre did not use any pharmacological anti-malarial prophylaxis (51.1%); 1/3 of the patients used medicines that were inappropriate for the geographical region of the world visited (29.8%) and 12.7% of the patients did not take the drugs in accordance with the recommendations of the physician. The studies carried out at the Department are presently the most complete epidemiological documentation of malaria cases imported into Poland from countries of different climatic and environmental conditions, in terms of place and route of travel to the tropics, nature and purpose of travel, length of stay in the endemic region and the specific risk factors relating to the use of mechanical and pharmacological anti-malarial prophylaxis.

Of the 54 cases of acute malaria episodes hospitalised or consulted at the Poznań Centre, 37 (68.5%) of the patients had no complications in the course of malaria, 8 cases (14.8%) were severe and 7 cases (13.0%) were evaluated as very severe. Two patients (3.7%) with multi-organ injuries in the course of complicated malaria, who were hospitalised in other hospitals in Poland, died. The most common clinical symptoms included: high fever preceded by chills (100%), hepatosplenomegaly (60.0%), impaired consciousness (22.2%), jaundice (22.2%), renal failure (22.2%), respiratory distress (16.7%), features of haemorrhagic diathesis (7.4%), less commonly metabolic acidosis (13.0%), liver failure (3.7%), and cardiovascular collapse (1.9%); multi-organ failure was observed in 14 examined patients (25.9%).



Based on the microscopic analysis of thick and thin blood films of the peripheral blood, stained with Giemsa method, *P. falciparum* was identified in 64.8% of those investigated, *P. vivax* invasion was diagnosed in 20.4% of cases, *P. ovale* or *P. malariae* was detected in 3.7% of investigated cases, while mixed infections constituted 11.1% of all the microscopic diagnoses.

Positive immunochromatographic test results for the presence of both the *P. falciparum* HRP-2 antigen and *Plasmodium* lactate dehydrogenase was found on the day of admission to the hospital in half of the investigated patients. Histidine-rich protein occurred independently in 18.5% of malaria cases, while the presence of pLDH *Plasmodium* spp., as the only detected antigen, was observed in 27.8% of investigated patients. Among the 54 cases of acute malaria diagnosed in the Department, the optical density values of enzyme immunoassay (ELISA) for the HRP-2 *P. falciparum* antigen ranged from 0.051 to 1.226 (mean  $0.623 \pm 0.494$ ). The presence of histidine-rich protein was confirmed in 61.1% of investigated patients, which formed 88.6% of patients with microscopically confirmed cases of *P. falciparum* and 80.5% of infections in which one of the identified species was *P. falciparum*. No developmental forms were observed in any of the 50 missionaries, neither were the specific antigens characteristic of *Plasmodium* spp. found in their peripheral blood.

The levels of HRP-2 *P. falciparum* antigen were statistically significantly higher in patients with complicated malaria, who presented with symptoms of renal or respiratory failure, signs of haemorrhagic diathesis with disseminated intravascular coagulation syndrome or impaired consciousness with signs of cerebral malaria, than in those who did not have the above organ complications. By analysing the parasitological markers of severe malaria caused by *P. falciparum*, such as high or critical parasitaemia, the presence of *P. falciparum* schizonts in the erythrocytes and hemozoin deposits in the leucocytes, it was demonstrated that patients in whom at least one malaria laboratory marker of unfavourable prognostic significance was detected in the peripheral blood smears, had statistically significantly higher mean values of the HRP-2 *P. falciparum* antigen than in those who did not reveal any microscopic characteristics of complicated malaria. It was demonstrated that malaria parasite-specific antigens were more often present in the peripheral blood after anti-parasitic treatment in patients with complicated malaria of severe and very severe course than in those with mild clinical course.

**Conclusions:** (1) The studies carried out at the Department showed that malaria is a common cause of febrile illnesses, requiring specialised differential diagnosis in tourists and missionaries returning to Poland from endemic tropical and subtropical areas; (2) In patients that were treated or consulted at the Poznań Centre, there was a correlation between the severity of the clinical picture of malaria and the lack of pre-travel medical consultation with a tropical medicine specialist, non-application of appropriate pharmacological anti-malarial

prophylaxis and embarking on business trips to Equatorial Africa, and long periods of stay exceeding 2 weeks; (3) The detection of *Plasmodium* spp. antigens in the peripheral blood proved to be a valuable, complementary diagnostic tool for the detection of malaria imported from areas of different climate and sanitary conditions, proceeding with low intensity of infection or caused by several species of *Plasmodium* spp., which makes the traditional microscopic evaluation difficult; (4) The determination of the level of *P. falciparum* HRP-2 antigen in the peripheral blood is of significant clinical and prognostic value for the assessment of the degree of severity of the clinical course of malaria, as well as in determining the risk of multi-organ failure, and in monitoring the effectiveness of anti-parasitic treatment.

**Keywords:** malaria, *Plasmodium* spp., tropical medicine, specific antigens, HRP-2, pLDH, clinical course, prognosis, treatment.

## 9. PIŚMIENICTWO

1. Abanyie F.A., Arguin P.M., Gutman J.: State of malaria diagnostic testing At clinical laboratories in the United States, 2010: a nationwide survey. *Malar. J.*, 2011; 10: 340 [<http://www.malariajournal.com/content/10/1/340>].
2. Adeoye G.O., Nga I.C.: Comparison of quantitative buffy coat technique (QBC) with Giemsa-stained thick film (GTF) for diagnosis of malaria. *Parasitol. Int.*, 2007; 56: 308-312.
3. Allam M.M., Alkadarou T.A.M.Y., Ahmed B.G., Elkhair I.S., Alansary E.H., Ibrahim M.E., Elhassan A.M.: Hyper-reactive malarial splenomegaly (HMS) in malaria endemic area in Eastern Sudan. *Acta Trop.*, 2008; 105: 196-199.
4. Al-Taiar A., Chandler C., Eryani A.S., Whitty C.J.: Knowledge and practices for preventing severe malaria in Yemen: the importance of gender in planning policy. *Health Policy Plan.*, 2009; 24(6): 428-437.
5. Angulo I., Fresno M.: Cytokines in the pathogenesis of and protection against malaria. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2002; 9(6): 1145-1152.
6. Ansah E.K., Narh-Bana S., Epokor M., Akanpigbiam S., Quartey A.A., Gyapong J., Whitty C.J.: Rapid testing for malaria in settings where microscopy is available and peripheral clinics where only presumptive treatment is available: a randomised controlled trial in Ghana. *BMJ*, 2010; 5: 340: c930, doi:10.1136/bmj.c930.
7. Aonuma H., Suzuki M., Iseki H., Perera N., Nelson B., Igarashi I., Yagi T., Kanuka H., Fukumoto S.: Rapid identification of *Plasmodium*-carrying mosquitoes using Loop-mediated Isothermal Amplification. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008; 376: 671–676.
8. Atarvanis-Tsakonas K., Tongren J.E., Riley E.M.: The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation, and immunopathology. *Clin. Exp. Immunol.*, 2003; 31: 260-262.
9. Baird J.K., Fryauff D.J., Hoffman S.L.: Primaquine for prevention of malaria in travelers. *Clin. Infect. Dis.*, 2003; 37: 1659-1667.
10. Batwala V., Magnussen P., Nuwaha F.: Are rapid diagnostic tests more accurate in diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria compared to microscopy at rural health centres? *Malar. J.*, 2010; 9: 349 [<http://www.malariajournal.com/content/9/1/349>].

11. Bayoh M.N., Mathias D.K., Odiere M.R., Mutuku F.M., Kamau L., Gimnig J.E., Vulule J.M., Hawley W.A., Hamel M.J., Walker E.D.: *Anopheles gambiae*: historical population decline associated with regional distribution of insecticide-treated bed nets in Western Nyanza Province, Kenya. *Malar. J.*, 2010; 26(9): 62 [<http://www.malariajournal.com/content/9/1/62>].
12. Bell D., Go R., Miguel C., Walker J., Cacal L., Saul A.: Diagnosis of malaria in a remote area of the Philippines: comparison of techniques and their acceptance by health workers and the community. *Bull. World Health Org.*, 2001; 79: 933-941.
13. Benito A., Rubio J.M.: Usefulness of seminested polymerase chain reaction for screening blood donors at risk for malaria in Spain. *Emerg. Infect. Dis.*, 2001; 7(6): 1068.
14. Bharti P.K., Alam M.T., Boxer R., Shukla M.M., Gautam S.P., Sharma Y.D., Singh N: Therapeutic efficacy of chloroquine and sequence variation in *pfcr* gene among patients with falciparum malaria in central India. *Trop. Med. Int. Health*, 2010;15: 33–40.
15. Blackburn B.G., Eigege A., Gotau H., Gerlong G., Miri E., Hawley W.A., Mathieu E., Richards F.: Successful integration of insecticide - treated bednet distribution with mass drug administration in Central Nigeria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2006; 75(4): 650-655.
16. Bojang K.A., Obaro S., Morison L.A., Greenwood B.M.: A prospective evaluation of a clinical algorithm for the diagnosis of malaria in Gambian children. *Trop. Med. Int. Health*, 2000; 5(4): 231-236.
17. Basseur P., Badiane M., Cisse M., Agnamey P., Vaillant M.T., Olliaro P.L: Changing patterns of malaria during 1996-2010 in an area of moderate transmission in southern Senegal. *Malar. J.*, 2011; 10: 203 [<http://www.malariajournal.com/content/10/1/203>].
18. Briggs C., Costa A.D., Freeman L., Aucamp I., Ngubeni B., Machin S.J.: Development of an automated malaria discriminant factor using VCS technology. *Am. J. Clin. Pathol.*, 2006;126: 691–698.
19. Bruneel F., Tubach F., Corne P., Megarbane B., Mira J.P., Peytel E., Camus C., Schortgen F., Azoulay E., Cohen Y., Georges H., Meybeck A., Hyvernats H., Trouillet J.L., Frenoy E., Nicolet L., Roy C., Durand R., Le Bras J., Wolff M., and

- Severe Imported Malaria in Adults Study: Severe imported falciparum malaria: a cohort study in 400 critically ill adults. *PLoS One*, 2010; 5(10): e13236.
20. Carrara V.I., Zwang J., Ashley E.A., Price R.N., Stepniowska K., Barends M., Brockman A., Anderson T., McGready R., Phaiphun L., Proux S., van Vugt M., Hutagalung R., Lwin K.M., Phyo A.P., Preechapornkul P., Imwong M., Pukrittayakamee S., Singhasivanon P., White N.J., Nosten F.: Changes in the treatment responses to artesunate - mefloquine on the northwestern border of Thailand during 13 years of continuous deployment. *PLoS One*, 2009; 4(2): e4551.
  21. Causer L.M., Bishop H.S., Sharp D.J., Flagg E.W., Calderon J.F., Keane V., Shah J.J., Macarthur J.R., Maloney S.A., Cetron M.S., Bloland P.B.: Rapid malaria screening and targeted treatment of United States - bound Montagnard refugees from Cambodia in 2002. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2005; 72(6): 688-693.
  22. Chanda E., Hemingway J., Kleinschmidt I., Rehman A.M., Ramdeen V., Phiri F.N., Coetzer S., Mthembu D., Shinondo C.J., Chizema-Kawesha E., Kamuliwo M., Mukonka V., Baboo K.S., Coleman M.: Insecticide resistance and the future of malaria control in Zambia. *PLoS One*, 2011; 6(9): e24336.
  23. Chandler C.I., Whitty C.J., Ansah E.K.: How can malaria rapid diagnostic tests achieve their potential? A qualitative study of a trial at health facilities in Ghana. *Malar. J.*, 2010; 9: 95 [<http://www.malariajournal.com/content/9/1/95>].
  24. Chandramohan D., Jaffar S., Greenwood B.: Use of clinical algorithms for diagnosing malaria. *Trop. Med. Int. Health*, 2002; 7(1): 45-52.
  25. Chiche L., Lesage A., Duhamel L.: Posttransplant malaria: first case of transmission of *Plasmodium falciparum* from a white multiorgan donor to four recipients. *Transplantation*, 2003; 75: 166-168.
  26. Chilton D., Malik A.N.J., Armstrong M., Kettelhut M., Parker-Williams J., Chiodini P.L.: Use of rapid diagnostic tests for diagnosis of malaria in the UK. *J. Clin. Pathol.*, 2006; 59: 862-866.
  27. Chiodini P.L., Bowers K., Jorgensen P., Barnwell J.W., Grady K.K., Luchavez J., Moody A.H., Cenizal A., Bell D.: The heat stability of *Plasmodium* lactate dehydrogenase - based and histidine-rich protein 2 - based malaria rapid diagnostic tests. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 2007; 101: 331-337.
  28. Chotivanich K., Silamut K., Day N.P.J.: Laboratory diagnosis of malaria infection - a short review of methods. *Aust. J. Med. Sci.*, 2006; 27:11-15.

29. Coleman R.E., Maneechai N., Rachapaew N., Kumpitak C., Soyseng V., Miller R.S., Thimasarn K., Sattabongkot J.: Field evaluation of the ICT malaria Pf/Pv immunochromatographic test for the detection of asymptomatic malaria in a *Plasmodium falciparum/vivax* endemic area in Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2002; 66(4): 379-383.
30. Congpuong K., Na-Bangchang K., Thimasarn K., Tasanor U., Wernsdorfer W.H.: Sensitivity of *Plasmodium vivax* to chloroquine in Sa Kaeo Province, Thailand. *Acta Trop.*, 2002; 83(2):117-121.
31. Cook G.C., Zumla A. (red.): Manson's Tropical Diseases. W.B. Saunders, Wydanie 22, 2009: 1-1830.
32. Cowman A.F., Kappe S.H.: Microbiology. Malaria's stealth shuttle. *Science*, 2006; 313(5791): 1245-1246.
33. Cox-Singh J., Davis T.M., Lee K.S., Shamsul S.S., Matusop A., Ratnam S., Rahman H.A., Conway D.J., Singh B.: *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin. Infect. Dis.*, 2008; 46: 165–171.
34. Craig M.H., Sharp B.C.: Comparative evaluation of four techniques for the diagnosis of *Plasmodium* infections. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1997; 91: 279-282.
35. Craig M.H., Bredenkamp B.L., Williams C.H., Rossouw E.J., Kelly V.J., Kleinschmidt I., Martineau A., Henry G.F.: Field and laboratory comparative evaluation of ten rapid malaria diagnostic tests. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 2002; 96: 258–265.
36. Crameri A., Marfurt J., Mugittu K., Maire N., Regos A., Coppee J.Y., Sismeiro O., Burki R., Huber E., Laubscher D., Puijalon O., Genton B., Felger I., Beck H.P.: Rapid microarray-based method for monitoring of all currently known single-nucleotide polymorphisms associated with parasite resistance to antimalaria drugs. *J. Clin. Microbiol.*, 2007; 45: 3685–3691.
37. Cuadros J., Calvente M. J., Benito A., Arévalo J., Calero M.A, Segura J., Rubio J.M.: *Plasmodium ovale* malaria acquired in Central Spain. *Emerg. Infect. Dis.*, 2002; 8(12): 1506–1508.
38. Danis K., Baka A., Lenglet A., Van Bortel W., Terzaki I., Tseroni M., Detsis M., Papanikolaou E., Balaska A., Gewehr S., Dougas G., Sideroglou T., Economopoulou A., Vakalis N., Tsiodras S., Bonovas S., Kremastinou J.:

- Autochthonous *Plasmodium vivax* malaria in Greece, 2011. *Euro Surveill.*, 2011; 16(42): pii=19993 [<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19993>].
39. Davies G.R., Venkatesan P.: Successful conservative management of splenic rupture in vivax malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 2002; 96, 149-150.
  40. Demirev P.A., Feldman A.B., Kongkasuriyachai D., Scholl P., Sullivan D. Jr., Kumar N.: Detection of malaria parasites in blood by laser desorption mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 2002; 74(14): 3262-3266.
  41. Diop S., Ndiaye M., Seck M., Chevalier B., Jambou R., Sarr A., Dièye T.N., Touré A.O., Thiam D., Diakhaté L.: Prevention of transfusion transmitted malaria in endemic area [francuski]. *Transfus. Clin. Biol.*, 2009; 16(5-6): 454-459.
  42. Doderer C., Heschung A., Guntz P., Cazenave J.P., Hansmann Y., Senegas A., Pfaff A.W., Abdelrahman T., Candolfi E.: A new ELISA kit which uses a combination of *Plasmodium falciparum* extract and recombinant *Plasmodium vivax* antigens as an alternative to IFAT for detection of malaria antibodies. *Malar J.*, 2007; 6: 19 [<http://www.malariajournal.com/content/6/1/19>].
  43. Dondorp A.M., Fanello C.I., Hendriksen I.C., Gomes E., Seni A., Chhaganlal K.D., Bojang K., Olaosebikan R., Anunobi N., Maitland K., Kivaya E., Agbenyega T., Nguah S.B., Evans J., Gesase S., Kahabuka C., Mtove G., Nadjm B., Deen J., Mwanga - Amumpaire J., Nansumba M., Karema C., Umulisa N., Uwimana A., Mokuolu O.A., Adedoyin O.T., Johnson W.B., Tshefu A.K., Onyamboko M.A., Sakulthaew T., Ngum W.P., Silamut K., Stepniewska K., Woodrow C.J., Bethell D., Wills B., Oneko M., Peto T.E., von Seidlein L., Day N.P., White N.J., and the AQUAMAT group: Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria in African children (AQUAMAT): an open-label, randomised trial. *Lancet*, 2010; 376(9753): 1647-1657.
  44. Durrand V., Berry A., Sem R., Glaziou P., Beaudou J., Fandeur T.: Variations in sequence and expression of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistant transporter (PfCRT) and the relationship to chloroquine resistance in vitro. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2004; 136(2): 273-285.
  45. Dzbeński T.H., Kacprzak E., Kajfasz P., Kierznikowicz B., Knap. J., Kubica-Biernat B., Myjak P., Nahorski W.L., Paul M., Pawłowski Z.S., Stefaniak J.: Malaria w Polsce i na świecie – wczoraj i dziś. Wydanie 2 uzup. Red. J.P. Knap i P. Myjak. *Wydawnictwo α-Medica Press*, Bielsko-Biała, 2009: 1-246.

46. Dziubek Z., Kajfasz P., Basiak W.: Zakażenie szpitalne zimnicą tropikalną w Polsce. *Wiad. Lek.*, 1993; 46(21-22): 860-863.
47. Erdman L.K., Kain K.C.: Molecular diagnostic and surveillance tools for global malaria control. *Travel Med. Infect. Dis.*, 2008; 6: 82–99.
48. Forney J.R., Magill A.J., Wongsrichanalai C., Sirichaisinthop J., Bautista C.T., Heppner D.G., Miller R.S., Ockenhouse C.F., Gubanov A., Shafer R., DeWitt C.C., Quino-Ascurra H.A., Kester K.E., Kain K.C., Walsh D.S., Ballou W.R., Gasser R.A. Jr.: Malaria rapid diagnostic devices: performance characteristics of the ParaSight F device determined in a multisite field study. *J. Clin. Microbiol.*, 2001; 39(8): 2884-2890.
49. Freedman D.: Malaria prevention in short-term travelers. *N. Engl. J. Med.*, 2008; 359(6): 603-612.
50. Garnham P.C.: Malaria parasites of man: life cycles and morphology. W: Malaria: principles and practice of malariology. *Churchil Livingstone*, Edinburgh, 1988: 61-69.
51. Garraud O., Andreu G.: Blood transfusion current situation in francophone African Countries: do the North and South point of views fit together? [francuski]. *Transfus. Clin. Biol.*, 2009; 16(5-6): 425-426.
52. Genton B., Smith T., Baea K., Narara A., Al.-Yaman F., Beck H.P., Hii J., Alpers M.: Malaria: how useful are clinical criteria for improving the diagnosis in a highly endemic area? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1994; 88: 537-541.
53. Gilles M.T.: Anopheles mosquitos: vector behaviour and bionomics. W: Malaria: principles and practice of malariology. *Churchil Livingstone*, Edinburgh, 1988: 453-485.
54. Gillet P., Mukadi P., Vernelen K., Van Esbroeck M., Muyembe J.J., Bruggeman C., Jacobs J.: External quality assessment on the use of malaria rapid diagnostic tests in a non-endemic setting. *Malar. J.*, 2010; 9: 359 [<http://www.malariajournal.com/content/9/1/359>].
55. Gillet P., Scheirlinck A., Stokx J., De Weggheleire A., Chauque H.S., Canhanga O.D.J.V., Tadeu B., Mosse C.D.D., Tiago A., Mabunda S., Bruggeman C., Bottieau E., Jacobs J.: Prozone in malaria rapid diagnostics tests: how many cases are missed? *Malar. J.*, 2011; 10: 166 [<http://www.malariajournal.com/content/10/1/166>].



56. Grau G.E., Frei K., Piguet P.F., Fontana A., Heremans H., Billiau A., Vassalli P., Lambert P.H.: Interleukin-6 production in experimental cerebral malaria: modulation by anticytokine antibodies and possible role in hypergammaglobulinemia. *J. Exp. Med.*, 1990; 172(5):1505-1508.
57. Grobusch M.P., Hänscheid T., Krämer B., Neukammer J., May J., Seybold J., Kun J.F., Suttorp N.: Sensitivity of hemozoin detection by automated flow cytometry in non- and semi-immune malaria patients. *Cytometry B Clin. Cytom.*, 2003; 55: 46–51.
58. Guthmann J.P., Ruiz A., Priotto G., Kiguli J., Bonte L., Legros D.: Validity, reliability and ease of use in the field of five rapid tests for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in Uganda. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 2002; 96: 254–257.
59. Hamel C.T., Blum J., Harder F., Kocher T.: Non-operative treatment of splenic rupture in malaria tropica: review of literature and case report. *Acta Trop.*, 2002; 82: 1-5.
60. Han E.T., Watanabe R., Sattabongkot J., Khuntirat B., Sirichaisinthop J., Iriko H., Jin L., Takeo S., Tsuboi T.: Detection of four *Plasmodium* species by genus- and species-specific loop-mediated isothermal amplification for clinical diagnosis. *J. Clin. Microbiol.*, 2007; 45: 2521–2528.
61. Hang V.T, Tran P.N., Hien L.V., Obreine E., Morris G.E.: Screening donor blood for malaria by polymerase chain reaction. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1995; 89: 44-47.
62. Hänscheid T.: Diagnosis of malaria: a review of alternatives to conventional microscopy. *Clin. Lab. Haematol.*, 1999; 21: 235–245.
63. Hänscheid T., Valadas E.: Malaria diagnosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1999; 61(2): 179.
64. Hawkes M., Kain K.C.: Advance in malaria diagnosis. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, 2007; 5: 1–11.
65. Hawkes M., Katsuva J.P., Masumbuko C.K.: Use and limitations of malaria rapid diagnostic testing by community health workers in war-torn Democratic Republic of Congo. *Malar. J.*, 2009; 8: 308 [<http://www.malariajournal.com/content/8/1/308>].
66. Hellemond J.J., Rutten M., Koelewijn R., Zeeman A.M., Verweij J.J., Wismans P.J., Kocken C.H., Genderen P.J.J.: Human *Plasmodium knowlesi* infection

- detected by rapid diagnostic tests for malaria. *Emerg. Infect. Dis.*, 2009; 15(9): 1478-1480.
67. Herwaldt B.L., Juranek D.D.: Laboratory acquired malaria, leishmaniasis, trypanosomiasis and toxoplasmosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1993; 48: 313-323.
  68. Houze S., Hubert V., Cohen D.P., Rivetz B., Le Bras J.: Evaluation of the Clearview malaria pLDH malaria rapid diagnostic test in a non-endemic setting. *Malar. J.*, 2011; 10: 284 [<http://www.malariajournal.com/content/10/1/284>].
  69. Hunt N.H., Golenser J., Chan-Ling T., Parekh S., Rae C., Potter S., Medana I.M., Miu J., Ball H.J.: Immunopathogenesis of cerebral malaria. *Int J Parasitol.*, 2006; 36(5): 569-582.
  70. Hutagalung R., Paiphun L., Ashley E.A., McGready R., Brockman A., Thwai K.L., Singhasivanon P., Jelinek T., White N.J., Nosten F.H.: A randomized trial of artemether-lumefantrine versus mefloquine - artesunate for the treatment of uncomplicated multi-drug resistant *Plasmodium falciparum* on the western border of Thailand. *Malar. J.*, 2005; 4: 46 [<http://www.malariajournal.com/content/4/1/46>].
  71. Iqbal J., Siddique A., Jameel M., Hira P.R.: Persistent histidine-rich protein 2, parasite lactic dehydrogenase and pan-malarial antigen reactivity after clearance of *Plasmodium* mono-infection: *J. Clin. Microbiol.*, 2002; 42(9): 4237-4241.
  72. Jelinek T.: Malaria self - testing by travellers: opportunities and limitations. *Travel Med. Infect. Dis.*, 2004; 2(3-4):143-148.
  73. Jelinek T.: Intravenous artesunate recommended for patients with severe malaria: position statement from TropNetEurop. *Euro Surveill.*, 2005; 10(11): e051124.5.
  74. Jelinek T.: Imported falciparum malaria in Europe: 2007 data from TropNetEurop. *Euro Surveill.*, 2008; 13(23): pii=18895 [<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?Articleid=18895>].
  75. Jelinek T., Grobusch M.P., Harms G.: Evaluation of a dipstick test for the rapid diagnosis of imported malaria among patients presenting within the network TropNetEurop. *Scand. J. Infect. Dis.*, 2001; 33(10): 752-754.
  76. Jowett M., Miller N.: The financial burden of malaria in Tanzania: implications for future government policy. *Int. J. Health Plann. Manage.*, 2005; 20: 67-84.

77. Kain K.C., Harrington M.A., Tennyson S., Keystone J.S.: Imported malaria: prospective analysis of problems in diagnosis and management. *Clin. Infect. Dis.*, 1998; 27(1):142-149.
78. Kain K.C., Keystone J.S.: Malaria in travelers. Epidemiology, disease, and prevention. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, 1998; 12(2): 267-284.
79. Katakai Y., Komaki-Yasuda K., Tangpukdee N., Wilairatana P., Krudsood S., Kano S.: Evaluation of the NOW Malaria Immunochromatographic Test for quantitative diagnosis of falciparum and vivax malaria parasite density. *Trop. Med. Health*, 2011; 39(4): 105-108.
80. Kattenberg J.H., Tahita C.M., Versteeg I.A.J., Tinto H., Traore-Coulibaly M., Schallig H.D.F.H., Mens P.: Antigen persistence of rapid diagnostic tests in pregnant women in Nanoro, Burkina Faso, and the implications for the diagnosis of malaria in pregnancy. *Trop. Med. Int. Health*, 2012; 17(5): 550-557.
81. Kitchen A.D., Chiodini P.L.: Malaria and blood transfusion. *Vox Sang.*, 2006; 90(2): 77-84.
82. Kleinschmidt I., Schwabe C., Shiva M., Segura J.L., Sima V., Mabunda S.J., Coleman M.: Combining indoor residual spraying and insecticide - treated net interventions. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2009; 81(3): 519-24.
83. Kocięcka W., Skoryna B., Jackowska B.: Przypadem zimnicy *Plasmodium falciparum* u pielęgniarki. *Pol. Tyg. Lek.*, 1990; XLV(36-37): 755-756.
84. Kocięcka W., Rehlis N., Kurczewska M., Mrozewicz B.: Clinical and parasitological appraisal of patients with imported malaria. *Med. Sci. Monit.*, 2000; 6(2): 356-360.
85. Kraemer S.M., Smith J.D.: A family affair: var genes, PfEMP1 binding, and malaria disease. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2006; 9(4): 374-80.
86. Kyabayinze D.J., Tibenderana J.K., Odong G.W., Rwakimari J.B., Counihan H.: Operational accuracy and comparative persistent antigenicity of HRP2 diagnostic tests for *Plasmodium falciparum* malaria in a hyperendemic region of Uganda. *Malar. J.*, 2008; 7: 221 [<http://www.malariajournal.com/content/7/1/221>].
87. Kyabayinze D.J., Asiimwe C., Nakanjako D., Nabakooza J., Counihan H., Tibenderana J.K.: Use of RDTs to improve malaria diagnosis and fever case management at primary health care facilities in Uganda. *Malar. J.*, 2010; 9: 200 [<http://www.malariajournal.com/content/9/1/200>].

88. de Langen A.J., van Dillen J., de Witte P., Mucheto S., Nagelkerke N., Kager P.: Automated detection of malaria pigment: feasibility for malaria diagnosing in an area with seasonal malaria in northern Namibia. *Trop. Med. Int. Health*, 2006; 11: 809–816.
89. de Laval F., Oliver M., Rapp C., de Santi V.P., Mendibil A., Deparis X., Simon F.: The challenge of diagnosing *Plasmodium ovale* malaria in travellers: report of six clustered cases in french soldiers returning from West Africa. *Malar. J.*, 2010; 9: 358 [<http://www.malariajournal.com/content/9/1/358>].
90. Lengeler C., Smith T.A., Armstrong-Schellenberg J.: Focus on the effect of bednets on malaria morbidity and mortality. *Parasitol. Today*, 1997; 13(3): 123-4 i 125-126.
91. Lindblade K.A., Dotson E., Hawley W.A., Bayoh N., Williamson J., Mount D., Olang G., Vulule J., Slutsker L., Gimnig J.: Evaluation of long-lasting insecticidal nets after 2 years of household use. *Trop. Med. Int. Health*, 2005; 10(11): 1141-1150.
92. Luchavez J., Espino F., Curameng P., Espina R., Bell D., Chiodini P., Nolder D., Sutherland C., Lee K.S., Singh B.: Human infections with *Plasmodium knowlesi*, the Philippines. *Emerg. Infect. Dis.*, 2008; 14: 811–813.
93. Luchavez J., Baker J., Alcantara S., Belizario V., Cheng Q., McCarthy J.S., Bell D.: Laboratory demonstration of a prozone-like effect in HRP2-detecting malaria rapid diagnostic tests: implications for clinical management. *Malar. J.*, 2011; 10: 286 [<http://www.malariajournal.com/content/10/1/286>].
94. Luxemburger C., Nosten F., Kyle D.E, Kiricharoen L., Chongsuphajaisiddi T., White N.J: Clinical features cannot predict a diagnosis of malaria or differentiate the infecting species in children living in areas of low transmission. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1998; 92: 45-49.
95. Magill A.J.: Malaria: diagnosis and treatment of falciparum malaria in travelers during and after travel. *Curr. Infect. Dis. Rep.*, 2006; 8: 35-42.
96. Majori G.: The long road to malaria eradication. *Lancet*, 2000; 354(Suppl. 4): 1-2.
97. Maltha J., Gillet P., Cnops L., van den Ende J., van Esbroeck M., Jacobs J.: malaria rapid diagnostic tests: *Plasmodium falciparum* infections with high parasite densities may generate false positive *Plasmodium vivax* pLDH lines. *Malar. J.*, 2010; 9: 198 [<http://www.malariajournal.com/content/9/1/198>].

98. Maltha J., Gillet P., Cnops L., Bottieau E., Van Esbroeck M., Bruggeman C., Jacobs J.: Evaluation of the rapid diagnostic test SDFK40 (Pf-pLDH/pan-pLDH) for the diagnosis of malaria in a non-endemic setting. *Malar. J.*, 2011; 10: 7 [<http://www.malariajournal.com/content/10/1/7>].
99. Mason D.P., Kawamoto F., Lin K., Laoboonchai A., Wongsrichanalai C.: A comparison of two rapid field immunochromatographic tests to expert microscopy in the diagnosis of malaria. *Acta Trop.*, 2002; 82(1): 51-59.
100. McGready R., Cho T., Samuel M.D., Villegas L., Brockman A., van Vugt M., Looareesuwan S., White N.J., Nosten F.: Randomized comparison of quinine-clindamycin versus artesunate in the treatment of falciparum malaria in pregnancy. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 2001; 95(6): 651-656.
101. Mendelow B.V., Lyons C., Nhlangothi P., Tana M., Munster M., Wypkema E., Liebowitz L., Marshall L., Scott S., Coetzer T.L.: Automated malaria detection by depolarization of laser light. *Br. J. Haematol.*, 1999; 104: 499–503.
102. Mikhail A.F., Leslie T.J., Mayan M.I., Zekria R., Mohammad N., Hasanzai M.A., Safi N., Whitty C.J., Rowland M.: Field trial of three different *Plasmodium vivax* - detecting rapid diagnostic tests with and without evaporative cool box storage in Afghanistan. *Malar. J.*, 2011; 10: 169 [<http://www.malariajournal.com/content/10/1/169>].
103. Miller L.H., Baruch D.I., Marsh K., Doumbo O.K.: The pathogenic basis of malaria. *Nature*, 2002; 415: 673–679.
104. Moody A.H., Chiodini P.L.: Non-microscopic method for malaria diagnosis using OptiMAL IT, a second-generation dipstick for malaria pLDH antigen detection. *Br. J. Biomed. Sci.*, 2002; 59(4): 228-231.
105. Morassin B., Fabre R., Berry A., Magnaval J.F.: One year's experience with the polymerase chain reaction as a routine method for the diagnosis of imported malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2002; 66: 503–508.
106. Mtove G., Hendriksen I.C., Amos B., Mrema H., Mandia V., Manjurano A., Muro F., Sykes A., Hildenwall H., Whitty C.J., Reyburn H.: Treatment guided by rapid diagnostic tests for malaria in Tanzanian children: safety and alternative bacterial diagnoses. *Malar. J.*, 2011; 10: 290 [<http://www.malariajournal.com/content/10/1/290>].
107. Mühlberger N., Jelinek T., Gascon J., Probst M., Zoller T., Schunk M., Beran J., Gjørup I., Behrens R.H., Clerinx J., Björkman A., McWhinney P., Matteelli A.,

- Lopez-Velez R., Bisoffi Z., Hellgren U., Puente S., Schmid M.L., Myrvang B., Holthoff-Stich M.L., Laferl H., Hatz C., Kollaritsch H., Kapaun A., Knobloch J., Iversen J., Kotłowski A., Malvy D.J.M., Kern P., Fry G., Siikamaki H., Schulze M.H., Soula G., Paul M., Gómez i Prat J., Lehmann V., Bouchaud O., da Cunha S., Atouguia J., Boecken G.: Epidemiology and clinical features of vivax malaria imported to Europe: Sentinel surveillance data from TropNetEurop. *Malar J.*, 2004; 3: 5 [<http://www.malariajournal.com/content/3/1/5>].
108. Murray C.K., Gasser R.A., Magill A.J., Miller R.S.: Update on rapid diagnostic testing for malaria. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2008; 21(1): 97-110.
109. Murray C.K., Bennett J.W.: Rapid diagnosis of malaria. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.*, 2009; doi:10.1155/2009/415953.
110. Myjak P., Nahorski W., Żarnowska-Prymek H., Pietkiewicz H.: Przydatność zestawu „Optimal Rapid Malaria Test” do szybkiego rozpoznawania malarii importowanej do Polski. *Wiad. Parazytol.*, 2004; 50(2): 193-199.
111. Nadjim B., Amos B., Mtove G., Ostermann J., Chonya S., Wangai H., Kimera J., Msuya W., Mtei F., Dekker D., Malahiyo R., Olomi R., Crump J.A., Whitty C.J., Reyburn H. : WHO guidelines for antimicrobial treatment in children admitted to hospital in an area of intense *Plasmodium falciparum* transmission: prospective study. *BMJ*, 2010; 340: c1350.
112. Ng O.T., Ooi E.E., Lee C.C., Lee P.J., Ng L.C., Pei S.W., Tu T.M., Loh J.P., Leo Y.S. : Naturally acquired human *Plasmodium knowlesi* infection, Singapore. *Emerg. Infect. Dis.*, 2008; 14: 814–816.
113. Ngsala B., Mubi M., Warsame M., Petzold M.G., Masele A.Y., Gustafsson L.L., Tomson G., Premji Z., Björkman A. : Impact of training in clinical and microscopy diagnosis of childhood malaria on anti-malarial drug prescription and health outcome at primary health care level in Tanzania: a randomized controlled trial. *Malar. J.*, 2008; 7: 199 [<http://www.malariajournal.com/content/7/1/199>].
114. Noedl H., Yingyuen K., Laoboonchai A., Fukuda M., Sirichaisinthop J., Miller S.: Sensitivity and specificity of an antigen detection ELISA for malaria diagnosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2006; 75(6): 1205-1208.
115. Ochola L.B., Vounatsou P., Smith T., Mabaso M.L., Newton C.R.: The reliability of diagnostic techniques in diagnosis and management of malaria in absence of a gold standard. *Lancet Infect. Dis.*, 2006; 6: 582–588.

116. Olliaro P.L, Nevill C., Lebrus J., Ringwald P., Garner P., Brasseur P.: Systematic review of amodiaquine treatment in uncomplicated malaria. *Lancet*, 1996; 34(8): 1196-1201.
117. O'Meara W., Mangeni J., Steketee R., Greenwood B.: Changes in the burden of malaria in sub-Saharan Africa. *Lancet Infect. Dis.*, 2010; 10: 505–576.
118. Padial M.M., Subirats M., Puente S., Lago M., Crespo S., Palacios G., Baquero M.: Sensitivity of laser light depolarization analysis for detection of malaria in blood samples. *J. Med. Microbiol.*, 2005; 54: 449–452.
119. Pagola S., Stephens P.W., Bohle D.S., Kosar A.D., Madsen S.K.: The structure of malaria pigment beta-haematin. *Nature*, 2000; 404(6775): 307-310.
120. Palacios G., Quan P.L., Jabado O.J., Conlan S., Hirschberg D.L., Liu Y., Zhai J., Renwick N., Hui J., Hegyi H., Grolla A., Strong J.E., Towner J.S., Geisbert T.W., Jahrling P.B., Büchen-Osmond C., Ellerbrok H., Sanchez-Seco M.P., Lussier Y., Formenty P., Nichol M.S., Feldmann H., Briese T., Lipkin W.I.: Panmicrobial oligonucleotide array for diagnosis of infectious diseases. *Emerg. Infect. Dis.*, 2007;13: 73–81.
121. Palmer C.J., Bonilla A., Bruckner D.A., Barnett E.D., Miller N.S., Haseeb M.A., Masci J.R., Stauffer W.M.: Multicenter study to evaluate the OptiMAL test for rapid diagnosis of malaria in U.S. hospitals. *J. Clin. Microbiol.*, 2003; 41(11): 5178-5182.
122. Pava Z., Echeverry D.F., Diaz G., Murillo C.: Short report: Large variation in detection of histidine-rich protein 2 in *Plasmodium falciparum* isolates from Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2010; 83(4): 834-837.
123. Pawłowski Z.S., Stefaniak J.: Malaria. W: Parazytologia kliniczna w ujęciu wielodyscyplinarnym. Red. Z.S. Pawłowski i J. Stefaniak. *Wydawnictwo Lekarskie PZWL*, Warszawa, 2004: 292-298.
124. Payne D.: Use and limitations of light microscopy for diagnosing malaria at the primary health care level. *Bull. World Health Organ.*, 1988; 66: 621–628.
125. Petersen E.: Malaria chemoprophylaxis: when should we use it and what are the options? *Expert Rev. Anti-infect. Ther.*, 2004; 2(1): 119-132.
126. Phyto A.P., Nkhoma S., Stepniewska K., Ashley E.A., Nair S., McGready R., ler Moo C., Al-Saai S., Dondorp A.M., Lwin K.M., Singhasivanon P., Day N.P., White N.J., Anderson T.J., Nosten F.: Emergence of artemisinin-resistant

- malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. *Lancet*, 2012; 379(9830):1960-1966.
127. Playford E.G., Walker J.: Evaluation of the ICT malaria P.f/P.v and the OptiMal rapid diagnostic tests for malaria in febrile returned travellers. *J. Clin. Microbiol.*, 2002; 40(11): 4166-4171.
128. Poon L.L., Wong B.W., Ma E.H., Chan K.H., Chow L.M., Abeyewickreme W., Tangpukdee N., Yuen K.Y., Guan Y., Looareesuwan S., Peiris J.S.: Sensitive and inexpensive molecular test for falciparum malaria: detecting *Plasmodium falciparum* DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification. *Clin. Chem.*, 2006; 52: 303–306.
129. Portero J.L., Rubio-Yuste M., Descalzo M.A., Raso J., Lwanga M., Obono J., Nseng G., Benito A., Cano J.: Accuracy of an immunochromatographic diagnostic test (ICT Malaria Combo Cassette Test) compared to microscopy among under five-year-old children when diagnosing malaria in Equatorial Guinea. *Malar. Res. Treat.*, 2010; doi:10.4061/2010/858427.
130. Pshenichnaya N. i Paul M.: Eastern Europe. W: Infectious Diseases. A Geographic Guide. E. Petersen, L.H. Chen and P. Schlagenhauf, eds. Wiley-Blackwell, Chichester (UK), 2011: 203-217.
131. Rakotonirina H., Barnadas C., Raheerijafy R., Andrianantenaina H., Ratsimbasoa A., Randrianasolo L., Jahevitra M., Andriantsoanirina V., Ménard D.: Accuracy and reliability of malaria diagnostic techniques for guiding febrile outpatient treatment in malaria-endemic countries. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2008; 78: 217–221.
132. Rehlis N., Pielok Ł., Kurczewska M.: Trudności diagnostyczne w zimnicy. Opis przypadków. *Biul. Met.-Org. Inst. Med. Morsk. Tropik.*, 1998; 31(3): 94-99.
133. Rehman A.M., Coleman M., Schwabe C., Baltazar G., Matias A., Gomes I.R., Yellott L., Aragon C., Nchama G.N., Mzilahowa T., Rowland M., Kleinschmidt I.: How much does malaria vector control quality matter: the epidemiological impact of holed nets and inadequate indoor residual spraying. *PLoS One*, 2011; 6(4): e19205.
134. Rijken M.J., Papageorghiou A.T., Thiptharakun S., Kiricharoen S., Dwell S.L., Wiladphaingern J., Pimanpanarak M., Kennedy S.H., Nosten F., McGready R.: Ultrasound evidence of early fetal growth restriction after maternal malaria infection. *PLoS One*, 2012; 7(2): e31411.



135. Rimón M.M., Kheng S., Hoyer S., Thach V., Ly S., Permin A.E., Pièche S.: Malaria dipsticks beneficial for IMCI in Cambodia. *Trop. Med. Int. Health*, 2003; 8(6): 536-543.
136. Rubio J.M., Buhigas I., Subirats M., Baquero M., Puente S., Benito A.: Limited level of accuracy provided by available rapid diagnosis tests for malaria enhances the need for PCR-based reference laboratories. *J. Clin. Microbiol.*, 2001; 39(7): 2736-2737.
137. Rubio J.M., Post R.J., van Leeuwen W.M., Henry M.C., Lindergard G., Hommel M.: Alternative polymerase chain reaction method to identify *Plasmodium* species in human blood samples: the semi-nested multiplex malaria PCR (SnM-PCR). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 2002; 96(Suppl. 1): S199-204.
138. Sachs J., Malaney P.: The economic and social burden of malaria. *Nature*, 2002; 415: 680–685.
139. Schlagenhauf P., Petersen E.: Malaria chemoprophylaxis: strategies for risk groups. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2008; 21(3): 466-472.
140. Scholl P.F., Kongkasuriyachai D., Demirev P.A., Feldman A.B., Lin J.S., Sullivan D.J. Jr, Kumar N.: Rapid detection of malaria infection in vivo by laser desorption mass spectrometry. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2004; 71: 546–551.
141. Seed C.R., Cheng A., Davis T.M., Bolton W.V., Keller A.J., Kitchen A., Cobain T.J.: The efficacy of a malarial antibody enzyme immunoassay for establishing the reinstatement status of blood donors potentially exposed to malaria. *Vox Sang.*, 2005; 88(2): 98-106.
142. Seed C.R., Cheng A., Seed C.R., Ismay S., Keller A.J.: Malaria antibody testing of Australian blood donors. *Vox Sang.*, 2011; 100(2): 252-253.
143. Simpson J.A., Price R., ter Kuile F., Teja-Isavatharm P., Nosten F., Chongsuphajaisiddhi T., Looareesuwan S., Aarons L., White N.J.: Population pharmacokinetics of mefloquine in patients with acute falciparum malaria. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1999; 66(5): 472-484.
144. Singh N., Shukla M.M., Shukla M.K., Mehra R.K., Sharma S., Bharti P.K., Singh M.P., Singh A., Gunasekar A.: Field and laboratory comparative evaluation of rapid malaria diagnostic tests versus traditional and molecular techniques in India. *Malar. J.*, 2010; 9: 191 [<http://www.malariajournal.com/content/9/1/191>].

145. Stefaniak J.: Leki przeciw inwazjom pasożytniczym. W: Parazytologia kliniczna w ujęciu wielodyscyplinarnym. Red. Z.S. Pawłowski i J. Stefaniak. *Wydawnictwo Lekarskie PZWL*, Warszawa, 2004: 62-69.
146. Stefaniak J., Paul M.: Malaria ciągłym wyzwaniem dla medycyny podróży XXI wieku. *Med. Dypl.*, 2010, 5(34): 27-33.
147. Steffen R., DuPont H.L., Wilder-Smith A.: Manual of Travel Medicine and Health. Wydanie trzecie. *B.C. Decker Inc.*, Hamilton, 2007: 1-594.
148. Suh K.N., Kain K.C, Keystone J.S.: Malaria. *CMAJ*, 2004; 170(11): 1693-1702.
149. Sullivan D.J., Matile H., Ridley R.G., Goldberg D.E.: A common mechanism for blockade of heme polymerization by antimalarial quinolines. *Biol. Chem. J.*, 1998: 273(47): 31103-31107.
150. Sykes A., Hendriksen I., Mtove G., Manda V., Mrema H., Rutta B., Mapunda E., Manjurano A., Amos B., Reyburn H., Whitty C.J.: Azithromycin plus artesunate versus artemether - lumefantrine for treatment of uncomplicated malaria in Tanzanian children: a randomized, controlled trial. *Clin. Infect. Dis.*, 2009; 49(8): 1195-1201.
151. Ta T.T., Salas A., Ali-Tammam M., Martínez M.C., Lanza M., Arroyo E., Rubio J.M.: First case of detection of *Plasmodium knowlesi* in Spain by Real Time PCR in a traveller from Southeast Asia. *Malar. J.* 2010; 9: 219 [<http://www.malariajournal.com/content/9/1/219>].
152. Tangpukdee N., Krudsood S., Thanachartwet V., Duangdee C., Paksala S., Chonsawat P., Srivilairit S., Looareesuwan S., Wilairatana P.: Predictive score of uncomplicated falciparum malaria patients turning to severe malaria. *Korean J. Parasitol.*, 2007; 45(4): 273-282.
153. Tangpukdee N., Duangdee C., Wilairatana P., Krudsood S.: Malaria diagnosis: a brief review. *Korean J. Parasitol.*, 2009; 47(2): 93-102.
154. Tangpukdee N., Krudsood S., Kano S., Wilairatana P.: Falciparum malaria parasitemia index for predicting severe malaria. *Int. J. Lab. Hematol.*, 2012; 34(3): 320-327.
155. Tchinda V.H., Tadem A.D., Tako E.A., Tene G., Fogako J., Nyonglema P., Sama G., Zhou A., Leke R.G.: Severe malaria in Cameroonian children: correlation between plasma levels of three soluble inducible adhesion molecules and TNF-alpha. *Acta Trop.*, 2007; 102(1): 20-28.

156. The RTS,S Clinical Trials partnership: First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 Malaria vaccine in African children. *N. Engl. J. Med.*, 2011; 365(20): 1863-1875.
157. Tjitra E., Suprianto S., Dyer M., Currie B.J., Anstey N.A.: Field evaluation of the ICT Malaria P.f/P.v immunochromatographic test for detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in patients with a presumptive clinical diagnosis of malaria in Eastern Indonesia. *J. Clin. Microbiol.*, 1999; 37(8): 2412-2417.
158. Vinetz J.M., Li J., McCutchan T.F., Kaslow D.C.: *Plasmodium malariae* infection in an asymptomatic 74-year-old Greek woman with splenomegaly. *N. Engl. J. Med.*, 1998, 338, 367-371.
159. Warrell D.A., Gilles H.M. (red.): Essential malariology. Wydanie czwarte. *Arnold*, 2002: 1-348.
160. Whitty C.J.: The RTS,S malaria vaccine. *BMJ*, 2011; 343: d6986.
161. Whitty C.J., Chandler C., Ansah E., Leslie T., Staedke S.G.: Deployment of ACT antimalarials for treatment of malaria: challenges and opportunities. *Malar. J.*, 2008; 7(Suppl. 1): S7 [<http://www.malariajournal.com/content/7/S1/S7>].
162. Whitty C.J., Checkley A.M., Smith A., Smith V., Blaze M., Bradley D., Chiodini P.L., Whitty C.J.: Risk factors for mortality from imported falciparum malaria in the United Kingdom over 20 years: an observational study. *BMJ*, 2012; 344: e2116.
163. WHO: Management of Severe Malaria. Wydanie drugie. *World Health Organization*, Geneva, 2000: 1-69.
164. WHO: World Malaria Report 2005. Prepared by Roll Back Malaria/WHO/UNICEF. *World Health Organization*, Geneva, 2005: 1-294.
165. WHO: The use of DDT in malaria vector control. WHO position statement. *World Health Organization*, Geneva, 2007:1-16.
166. WHO: World malaria report 2008. *World Health Organization*, Geneva, 2008: 1-190.
167. WHO: World malaria report 2011. *World Health Organization*, Geneva, 2011a: 1-248.
168. WHO: Malaria rapid diagnostic test performance. Results of WHO product testing of malaria RDTs: Round 3 (2010-2011). *World Health Organization*, Geneva, 2011b: 1-124.

169. Williams H.A., Causer L., Metta E., Malila A., O'Reilly T., Abdulla S., Kachur S.P., Bloland P.B.: Dispensary level pilot implementation of rapid diagnostic tests: an evaluation of RDT acceptance and usage by providers and patients – Tanzania, 2005. *Malar. J.*, 2008; 7: 239 [<http://www.malariajournal.com/content/7/1/239>].
170. Wilson M.L.: Malaria rapid diagnostic tests. *Clin. Infect. Dis.*, 2012; 54(11): 1637-1641.
171. Wongsrichanalai C., Pickard A.L., Wernsdorfer W.H., Meshinck S.R.: Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect. Dis.*, 2002, 2: 209-218.
172. Wongsrichanalai C., Barcus M.J., Muth S., Sutamihargja A., Wernsdorfer W.H.: A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2007; 77(Suppl. 6): 119-127.

## 10. SPIS TABEL

**Tabela I.** Ocena stanu świadomości i przytomności pacjentów z malarią, hospitalizowanych i konsultowanych w Klinice Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych w Poznaniu, wg skali Glasgow.

**Tabela II.** Kryteria kliniczne i laboratoryjne ciężkiej malarii, stosowane u pacjentów hospitalizowanych i konsultowanych w Klinice Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych (wg Światowej Organizacji Zdrowia, 2000).

**Tabela III.** Wykładniki kliniczne i laboratoryjne o niekorzystnym znaczeniu prognostycznym w powikłanych przypadkach zimnicy wywoływanej przez *P. falciparum* (wg Światowej Organizacji Zdrowia, 2000).

## 11. SPIS RYCIN

**Rycina 1.** Chłopiec 2-letni hospitalizowany z powodu zagrażającej życiu malarii mózgowej wywołanej przez *Plasmodium falciparum*. *Kenya Medical Research Institute* w Kilifi (Kenia).

**Rycina 2.** Rozprzestrzenienie geograficzne oraz liczba zarejestrowanych przypadków malarii na świecie w 2010 roku (wg Światowej Organizacji Zdrowia, 2012).

**Rycina 3.** Tropikalny las deszczowy strefy równikowej, środowiskiem sprzyjającym transmisji zarodźców zimnicy przez komary z rodzaju *Anopheles*. Osada w Dżungli Amazońskiej, Iquitos (Peru).

**Rycina 4.** Cechy morfologiczne różnych stadiów rozwojowych komarów z rodzaju *Anopheles*: A) postać larwalna rozwijająca się w zbiornikach wodnych, B) postać dorosła (imago).

**Rycina 5.** Cykl rozwojowy zarodźców zimnicy chorobotwórczych dla człowieka. Wg *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, Atlanta) w modyfikacji własnej.

**Rycina 6.** Różne formy edukacji zdrowotnej w zakresie zapobiegania malarii dla mieszkańców strefy endemicznej. *St. Francis Hospital* w Bulubie (Uganda).

**Rycina 7.** Pozostawione pojemniki na wodę do pojenia zwierząt gospodarskich czynnikiem sprzyjającym namnażaniu się komarów przenoszących zarodźce zimnicy. Rejon Kyenjojo w Ugandzie (Afryka).

**Rycina 8.** Moskitiera nasączona środkiem owadobójczym oraz siatki w oknach skutecznie chronią w porze nocnej przed ukłuciami komarów przenoszących malarię. Kampus uniwersytecki w *Kilimanjaro Cristian Medical Centre*, Moshi (Tanzania).

**Rycina 9.** Środek odstraszaający komary (repellent) do stosowania na skórę, zawierający 50% stężenie dietylenotoluamidu (Mugga). Kolekcja własna.

**Rycina 10.** Plantacja bylicy jednorocznej (*Artemisia annua*) w Fort Portal (Uganda).

**Rycina 11.** Masywna splenomegalia w badaniu ultrasonograficznym jamy brzusznej u 24-letniego pacjenta z malarią *P. falciparum* importowaną z Nigerii. Aparat Aloka Alpha-7 (Japonia). Kolekcja własna Kliniki.

**Rycina 12.** Niekorzystne markery prognostyczne w ciężkiej malarii wywołanej przez *P. falciparum*. A) Liczne złoże hemozoiny w cytoplazmie monocytu. B) Obecność pojedynczych schizontów *P. falciparum* w erytrocytach krwi obwodowej. Kolekcja własna Kliniki.

**Rycina 13.** Cechy morfologiczne poszczególnych gatunków *Plasmodium* sp. w zarażonych erytrocytach w cienkim rozmazie krwi obwodowej. A) Młode trofozoity *P. falciparum*. B) Dojrzały schizont *P. vivax*. C) Późny trofozoit *P. ovale*. D) Trofozoit *P. malariae*. Kolekcja własna Kliniki.

**Rycina 14.** Zasady interpretacji wyników testu immunochromatograficznego w kierunku malarii. A) Wynik ujemny. B) Wynik dodatni dla *P. falciparum*. C) Wynik dodatni dla *P. vivax* i innych gatunków niż *P. falciparum*. D) Wynik dodatni wskazujący na obecność *P. falciparum* lub malarii mieszanej. Kolekcja własna Kliniki.

**Rycina 15.** Docelowy kontynent podróży pacjentów hospitalizowanych lub konsultowanych w Klinice, u których potwierdzono malarię (n=47).

**Rycina 16.** Kraje docelowe podróży pacjentów hospitalizowanych lub konsultowanych w Klinice, u których potwierdzono malarię (n=47).

**Rycina 17.** Cel podróży pacjentów hospitalizowanych lub konsultowanych w Klinice, u których potwierdzono malarię (n=47).

**Rycina 18.** Długość pobytu w strefie endemicznej pacjentów z ostrą malarią potwierdzoną w Klinice (n=47).

**Rycina 19.** Częstość wykonywania konsultacji lekarskich u specjalisty medycyny podróży przed wyjazdem do krajów strefy tropikalnej wśród 46 pacjentów, u których potwierdzono malarię w Ośrodku Poznańskim.

**Rycina 20.** Rodzaj stosowanej farmakologicznej profilaktyki przeciwmalarycznej u pacjentów hospitalizowanych lub konsultowanych w Klinice, u których potwierdzono zimnicę (n=47).

**Rycina 21.** Docelowy kontynent podróży pacjentów grupy kontrolnej hospitalizowanych w Klinice, u których wykluczono malarię (n=50).

**Rycina 22.** Klasyfikacja przebiegu klinicznego przypadków malarii hospitalizowanych lub konsultowanych w Klinice (n=54).

**Rycina 23.** Przykładowy przebieg toru gorączkowego u pacjentów z malarią *P. falciparum* i *P. vivax* hospitalizowanych w Klinice.

**Rycina 24.** Czarnomocz zimniczy jako niekorzystny marker prognostyczny powikłanej malarii. Kolekcja własna Kliniki.

**Rycina 25.** Dolegliwości kliniczne zgłaszane przez pacjentów z malarią, hospitalizowanych lub konsultowanych w Klinice (n=54).

**Rycina 26.** Objawy kliniczne stwierdzone u pacjentów z malarią, hospitalizowanych lub konsultowanych w Klinice (n=54).

**Rycina 27.** Wykładniki kliniczne i laboratoryjne powikłanej malarii u 8 pacjentów z ciężkim przebiegiem choroby, hospitalizowanych w Klinice.

**Rycina 28.** Wykładniki kliniczne i laboratoryjne powikłanej malarii u 7 pacjentów z bardzo ciężkim przebiegiem choroby, hospitalizowanych lub konsultowanych w Klinice.

**Rycina 29.** Egzotyczne choroby pasożytnicze i infekcyjne rozpoznane u pacjentów z grupy kontrolnej (n=50).

**Rycina 30.** Rodzaj swoistej terapii przeciw pasożytniczej stosowanej w przypadkach malarii rozpoznanych w Klinice (n=54).

**Rycina 31.** Odchylenia laboratoryjne u pacjentów z malarią rozpoznaną w Klinice (n=54).

**Rycina 32.** Częstość występowania poszczególnych gatunków *Plasmodium* spp. we krwi obwodowej badanych pacjentów z malarią, hospitalizowanych lub konsultowanych w Klinice (n=54).

**Rycina 33.** Zależność pomiędzy rozpoznaniem gatunku zarodźca zimnicy, a kierunkiem podróży pacjentów z malarią, hospitalizowanych lub konsultowanych w Klinice (n=54).

**Rycina 34.** Zależność pomiędzy celem podróży do krajów strefy międzyzwrotnikowej i subtropikalnej a gatunkiem zarodźca zimnicy rozpoznany w Klinice (n=54).

**Rycina 35.** Zależność pomiędzy rozpoznaniem gatunku *Plasmodium* spp. a charakterem przebiegu klinicznego malarii u pacjentów hospitalizowanych lub konsultowanych w Klinice (n=54).



**Rycina 36.** Zależność pomiędzy przebiegiem klinicznym malarii a rozpoznaniem gatunku *Plasmodium* spp. u pacjentów hospitalizowanych lub konsultowanych w Klinice (n=54).

**Rycina 37.** Częstość występowania niekorzystnych wykładników parazytologicznych powikłanej malarii u pacjentów hospitalizowanych lub konsultowanych w Klinice (n=54).

**Rycina 38.** Porównanie wyników występowania swoistych przeciwciał w kierunku *Plasmodium* spp. u pacjentów z malarią (n=54) oraz w grupie kontrolnej (n=50).

**Rycina 39.** Porównanie częstości wykrywania poszczególnych antygenów zarodźca zimnicy w teście immunochromatograficznym w odniesieniu do rozpoznania mikroskopowego u pacjentów z malarią hospitalizowanych i konsultowanych w Klinice (n=54).

**Rycina 40.** Profil wykrywanych antygenów zarodźca zimnicy w teście immunochromatograficznym w zależności od rozpoznania mikroskopowego u pacjentów z malarią hospitalizowanych i konsultowanych w Klinice (n=54).

**Rycina 41.** Rozkład swoistych antygenów zarodźca zimnicy we krwi obwodowej w zależności od przebiegu klinicznego malarii u pacjentów hospitalizowanych lub konsultowanych w Klinice (n=54).

**Rycina 42.** Częstość wykrywania poszczególnych antygenów zarodźca zimnicy we krwi obwodowej u pacjentów z malarią przed i po ukończeniu swoistego leczenia.

**Rycina 43.** Porównanie częstości wykrywania poszczególnych antygenów zarodźca zimnicy w teście immunochromatograficznym po zakończeniu leczenia, w odniesieniu do rozpoznania mikroskopowego u pacjentów z malarią hospitalizowanych w Klinice (n=51).

**Rycina 44.** Profil wykrywanych antygenów zarodźca zimnicy w teście immunochromatograficznym po zakończeniu leczenia, w zależności od rozpoznania mikroskopowego u pacjentów z malarią hospitalizowanych w Klinice (n=51).

**Rycina 45.** Częstość wykrywania antygenu HRP-2 *P. falciparum* u pacjentów z malarią hospitalizowanych lub konsultowanych w Klinice w zależności od rozpoznania mikroskopowego (n=54).

**Rycina 46.** Ocena korelacji poziomów antygenu HRP-2 *P. falciparum* we krwi obwodowej z obrazem klinicznym malarii.

**Rycina 47.** Ocena korelacji poziomów antygenu HRP-2 *P. falciparum* we krwi obwodowej z długością hospitalizacji pacjentów w Ośrodku Poznańskim.

**Rycina 48.** Ocena korelacji poziomów antygenu HRP-2 *P. falciparum* we krwi obwodowej z długością utrzymywania się stanów gorączkowych podczas leczenia w Klinice.

**Rycina 49.** Ocena korelacji poziomów antygenu HRP-2 *P. falciparum* we krwi obwodowej w zależności od czasu zgłoszenia się pacjentów do szpitala.

**Rycina 50.** Ocena korelacji poziomów antygenu HRP-2 *P. falciparum* we krwi obwodowej w zależności od występowania cech skazy krwotocznej i zaburzeń krzepnięcia krwi.

**Rycina 51.** Ocena korelacji poziomów antygenu HRP-2 *P. falciparum* we krwi obwodowej w zależności od występowania objawów niewydolności nerek.

**Rycina 52.** Ocena korelacji poziomów antygenu HRP-2 *P. falciparum* we krwi obwodowej w zależności od występowania zaburzeń świadomości i cech malarii mózgowej.

**Rycina 53.** Ocena korelacji poziomów antygenu HRP-2 *P. falciparum* we krwi obwodowej w zależności od występowania objawów niewydolności oddechowej.

**Rycina 54.** Ocena korelacji poziomów antygenu HRP-2 *P. falciparum* we krwi obwodowej w zależności od występowania parazytologicznych wykładników powikłanej malarii w klasycznym badaniu mikroskopowym.

**Rycina 55.** Ostateczne rozpoznanie malarii u pacjentów hospitalizowanych i konsultowanych w Klinice, ustalone na podstawie skojarzonego zastosowania badania mikroskopowego oraz oznaczania swoistych antygenów *Plasmodium* spp. we krwi obwodowej (n=54).

## 12. OBJAŚNIENIA UŻYWANYCH SYMBOLI I SKRÓTÓW

**ACC:** automatyczny analizator komórkowy (ang. *Automated Blood Cell Counter*)

**ACT:** skojarzone leczenie malarii oparte na preparatach artemizyny (ang. *Artemisine-based Combined Therapy*)

**APTT:** czas częściowej tromboplastyny po aktywacji

**ARDS:** zespół ostrej niewydolności oddechowej (ang. *Acute Respiratory Distress Syndrome*)

**C3, C4:** składniki dopełniacza (komplementu)

**CD36:** powierzchniowy antygen różnicowy krwinek białych (ang. *leucocyte differentiation antigen*)

**CDC:** Centrum Kontroli i Zwalczenia Chorób Zakaźnych w Atlancie (ang. *Centers for Disease Control and Prevention*)

**DEET:** dietyleno-toluamid, repelent odstraszający owady

**DDT:** 2,2-bis-(*p*-chlorofenylo)-1,1,1-trichloroetan, środek owadobójczy działający na postaci dorosłe komarów

**DIC:** zespół rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (ang. *Disseminated Intravascular Coagulation*)

**DNA:** kwas dezoksyrybonukleinowy

**Dz. U.:** Dziennik Ustaw Rzeczypospolitej Polskiej

**ECDC:** Europejskie Centrum Kontroli i Zwalczenia Chorób Zakaźnych w Sztokholmie (ang. *European Centre for Disease Control and Prevention*)

**EDTA:** wersenian dwusodowy

**ELISA:** technika immunoenzymatyczna (ang. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

**GCS:** skala oceny poziomu zaburzeń świadomości wg Glasgow (ang. *Glasgow Coma Scale*)

**GPI:** glikozylofosfatydyloinozytol, lipid zarodźca zimnicy wiążący białko powierzchniowe merozoitów

**HBV:** wirus zapalenia wątroby typu B (ang. *Hepatitis B Virus*)

**HCH:** gamma-benzeno-heksachloran, środek owadobójczy z grupy chlorowanych węglowodorów

**Hgb:** hemoglobina

**HIV:** ludzki wirus niedoboru odporności (ang. *Human Immunodeficiency Virus*)

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** nadtlenek wodoru

**HRP-2:** białko bogate w histydynę swoiste dla zarodźca sierpowatego (ang. *Histidine-Rich Protein*)

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:** kwas siarkowy

**HTK:** hematokryt

**ICAM-1:** międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna (ang. *Intercellular Adhesion Molecule*)

**IFA:** technika immunofluorescencji pośredniej (ang. *Indirect Fluorescent Antibody Test*)

**IFN-γ:** interferon-gamma

**IgG:** immunoglobuliny klasy G

**IgM:** immunoglobuliny klasy M

**IL:** interleukina

**INR:** międzynarodowy współczynnik znormalizowanego czasu protrombinowego

**IPT:** przerywane leczenie profilaktyczne malarii (ang. *Intermittent Preventive Treatment*)

**IRS:** rozpylanie środków owadobójczych wewnątrz pomieszczeń mieszkalnych (ang. *Indoor Residual Spraying*)

**ITN:** moskitiera nasączona środkiem owadobójczym (ang. *Insecticide Treated Net*)

**i.v.:** dożylna droga podania leku

**LAMP:** izotermiczna amplifikacja genowa (ang. *Loop-Mediated Isothermal Amplification*)

**LDMS:** spektrofotometria masowa z pomiarem bezpośredniej absorpcji światła ultrafioletowego emitowanego przez laser (ang. *Direct Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry*)

**LLITN:** moskitiera nasączona środkiem owadobójczym o przedłużonym działaniu (ang. *Long- Lasting Insecticide Treated Net*)

**MESA:** białko powierzchniowe erytrocytów zarażonych zarodźcem zimnicy (ang. *Membrane Erythrocyte Surface Antigen*)

**MSP-1:** białko powierzchniowe merozoitów zarodźca zimnicy (ang. *Merozoite Surface Protein*)

**OD:** gęstość optyczna (ang. *optical density*)

**OUN:** ośrodkowy układ nerwowy

**PBS:** sól fizjologiczna buforowana fosforanami (ang. *phosphate buffered saline*)

**PCR:** łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. *Polymerase Chain Reaction*)

**PECAM-1 (CD31):** płytkowo-śródbłonkowa cząsteczka adhezyjna (ang. *Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule*)

**PfEMP-1:** białko powierzchniowe erytrocytów zarażonych *P. falciparum* (ang. *P. falciparum Erythrocyte Membrane Protein*)

**pH:** ilościowa skala kwasowości i zasadowości roztworów wodnych związków chemicznych

**pLDH:** dehydrogenaza mleczanowa swoista dla *Plasmodium* spp. (ang. *Parasite Lactate Dehydrogenase*)

**p.o.:** doustna droga podania leku (łac. *per os*)

**QBC:** analiza kożuszka leukocytnego i innych frakcji krwi po odwirowaniu (ang. *Quantitative Buffy Coat*)

**Real-time PCR:** łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym

**RDT:** szybki test diagnostyczny, w rozprawie - test immunochromatograficzny wykrywający antygeny zarodźca zimnicy (ang. *Rapid Diagnostic Test*)

**RNA:** kwas rybonukleinowy

**SMC:** sezonowa chemioprowfilaktyka przeciwmalaryczna (ang. *Seasonal Malaria Chemoprevention*)

**TMB:** 3,3',5,5'- tetrametylenobenzodyna, substrat reakcji immunoenzymatycznej

**TNF (TNF- $\alpha$ ):** czynnik martwicy nowotworów (ang. *Tumor Necrosis Factor*)

**USA:** Stany Zjednoczone Ameryki Północnej

**WBC:** leukocyty krwi obwodowej (ang. *White Blood Cells*)

**WHO:** Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*)