

ДИАГНОСТИКА МАЛЯРИИ В НЕЭНДЕМИЧНЫХ РЕГИОНАХ: ЦЕННОСТЬ, ОГРАНИЧЕНИЯ И ДОПОЛНЕНИЕ СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ

М.-П. Бренье-Пиншар, К. Пинель, Р. Грийо, П. Амбруаз-Тома.

(Франция, Гренобль. Госпитально-университетский центр, генеральный директор – проф. Жан-Пьер Бастар; Отдел медицинской молекулярной паразитологии и микологии)

Резюме. Биологическая диагностика малярии является жизненно важной проблемой неотложной медицины. Во Франции ежегодно наблюдают более 5000 случаев завозной малярии. Анализ тонких мазков крови фиксированных и окрашенных остается утвержденным методом диагностики малярии, хотя этот способ требует от исполнителя определенного опыта, которым обладают далеко не все из практикующих лаборантов. Существует желание заменить этот способ другими более простыми (тест QBC®) или не зависящими от персональной компетенции исполнителей методами (тест-полоски для обнаружения антигенов плазмодиев – ParaSight® и ICT Malaria Pf®), однако эти тесты продемонстрировали большое количество ошибочных результатов. Следовательно, эти различные методы должны рассматриваться как дополняющие и, если возможно, желательно их использовать одновременно. Лучшим сочетанием представляется: тест QBC® – тонкий мазок – определение плазмодийных антигенов (ParaSight® или ICT Malaria Pf®).

Ключевые слова: Малярия. Диагностика. Тонкий мазок. Тест QBC®. Тест Para Sight®. Определение HRP II.

В течение длительного времени малярия не является больше эндемичной во французской метрополии и это заболевание только персистирует в некоторых заморских департаментах и территориях (Французская Гвиана, Мартиника и, может быть, Гваделупа) [1]. Тем не менее, во Франции ежегодно наблюдают более 5000 случаев импортированной (завозной) малярии у туристов или у иммигрантов, зараженных в заморских территориях [2]. Диагностика малярии в большинстве случаев является срочной и жизненно важной. Малярия, вызванная *Plasmodium falciparum*, может быть смертельной, в частности у субъектов, не предохранявшихся от укусов (каковыми является большинство туристов), или в случаях поздней диагностики и лечения заболевания.

В течение многих десятилетий, в частности после открытия *Plasmodium* Лавраном (Laveran) в 1880 году, биологическая диагностика малярии основывается на микроскопическом исследовании тонкого мазка или толстой капли, предварительно окрашенных по методу May Grunwald Giemsa (MGG). Эта диагностика чисто морфологическая и она относительно легко выполнима у больных с высокой паразитемией и, напротив, она трудна в случаях низкой паразитемии, особенно если возбудитель представлен атипичными формами, что затрудняет точную идентификацию вида плазмодия (это более важно с прогностической, нежели с терапевтической точки зрения). Кроме того, чтобы утверждать, что результат микроскопического исследования отрицательный, необходимо провести изучение препарата в течение довольно длительного времени (30 мин. на исследование тонкого мазка, в соответствии с рекомендациями

ВОЗ). Речь идет о требовании, которое на практике нередко нарушается.

Эти трудности и эти противоречия, характерные для традиционных методов, особенно значимы, в частности для неспециализированных лаборантов, которых оказывается большинство во французской метрополии. Однако, в течение последних лет предложены новые методы диагностики малярии. Речь идет о технике концентрации образца с последующим его окрашиванием флуорохромом и флуоресцентной микроскопией (Quantitative Buffy Coat или тест QBC®), об обнаружении растворимых плазмодийных антигенов (насыщенный гистидином протеин II – Histidine Rich Proteine II или HRP II) или одного из плазмодийных ферментов (паразитарной лактат дегидрогеназы – Lactate Deshydrogenase Parasitaire или pLDH).

Основываясь на опыте многих лет [3-5] сравнительного изучения этих трех методов (тонкий мазок, тест QBC®, определения HRP II ParaSight®-тестом), мы представляем их в данной работе с практической точки зрения. Зато, мы исключили из этого исследования существующие серологические методы, методы молекулярной биологии и изучение pLDH. Серологическая диагностика малярии, являясь одним из наиболее современных иммунофлуоресцентных методов исследований, применяемых для предупреждения посттрансфузионной малярии [6,7] или для эпидемиологических целей [8], не представляет интереса для клинической практики, вследствие того, что антиплазмодийные антитела длительно персистируют в организме. Методы молекулярной биологии могут быть ценны для посттерапевтического кон-

троля (дифференциальной диагностики рецидива заболевания и нового заражения) [9] или в будущем для предупреждения посттрансфузионной малярии [10], но их применение для диагностики малярии еще ограничено [11-13]. Наконец, мы не будем рассматривать полученные результаты по обнаружению изоформ pLDH. Этот тест уже применяется во многих странах для диагностики малярии, вызванной *Plasmodium falciparum* [14,15] и вскоре будет использован для определения других трех видов плазмодиев, паразитирующих в организме человека, но он еще официально не утвержден во Франции.

Обсуждаемые методы (табл.1)

Микроскопическое исследование тонких мазков или толстой капли, фиксированных и окрашенных по методу Giemsa (MGG)

Речь идет об утвержденной методике. Существуют различные точки зрения на наиболее предпочтительный момент исследования (перед приступом – в период апиреksии или во время приступа – на высоте гипертермии). Несколько капель крови, получают после укола скарификатором дистальной фаланги пальца, мочки уха или пятки (у маленьких детей). Для тонкого мазка капли крови равномерно распределяют на тщательно обезжиренном и отмытом стекле, однократно подсушивают, фиксируют абсолютным метанолом и окрашивают раствором Giemsa (MGG). Время подготовки препарата составляет от 30 до 40 мин. Качество выполнения мазка и его окрашивания являются основными характеристиками, позволяющими получить достоверные результаты мик-

роскопии. В случае плохого выполнения мазка (неодноклеточного слоя) он оказывается “нечитаемым”. Плохо окрашенный мазок (слишком светлый, слишком темный, с потеками краски) может быть причиной ошибочных результатов. Микроскопическое исследование проводят с иммерсией, объектив100 (увеличение $\times 700$ до $\times 1000$) изучением от 50 до 100 полей зрения, для чего требуется около 10 мин [16] (30 мин. для того, чтобы дать отрицательное заключение), микроскопирование позволяет выявить паразитемию при содержании плазмодиев около 150 *plasmodium*/ μ l [17]. Этот порог, естественно, зависит от числа исследуемых полей зрения и от персонального опыта лаборанта. Паразитемию обычно выражают в процентах числа инвазированных эритроцитов на 50 или 100 клеток. Исследование тонкого мазка позволяет, и это главное, на основании имеющихся морфологических критериев, идентифицировать вид или виды плазмодия (плазмодиев), ответственных за возникновение заболевания.

Это исследование является наиболее широко используемым для диагностики малярии. Среди всех объявленных случаев малярии, по данным Национального центра регистрации завозных болезней – Centre National de Référence pour les Maladies d’Importation (CNRMI), в более 95% случаев заболевание было диагностировано методом тонкого мазка, изолированным (50%) или в сочетании с методом толстой капли (34,4%), или в комплексе с тестом QBC®(11,3%).

Метод толстой капли (толстого мазка), на сегодняшний день, остается рекомендованным ВОЗ. Он позволяет “концентрировать” плазмодиев в

Таблица 1.

Характеристика технических особенностей и возможностей используемых в практике методов диагностики малярии

	Толстая капля	Тонкий мазок	QBC®-малярия	Определение растворимых антигенов	
				ParaSight®	ICT- малярия Pf®
Время выполнения	2-2,5 часа	20-30 мин.			
Время прочтения	Длительно	Длительно	Быстро	Мгновенно	Мгновенно
Легкость прочтения	Трудно	Иногда трудно	Довольно легко	Очень легко	Очень легко
Видовая диагностика	Да	Да	Нет	Только <i>Plasmodium falciparum</i>	Только <i>Plasmodium falciparum</i>
Определение степени паразитемии	Да	Да	Нет	Нет	Нет
Необходимое оборудование	Предметное стекло, оптический микроскоп	Предметное стекло, оптический микроскоп	Флуоресцентный микроскоп и специальный объектив (иммерсия $\times 50$)	Нет	Нет
Утверждение A.F.S.S.A.P.S.	/	/	Да (Becton Dickinson)	Да (Becton Dickinson)	Да (Fumouze)
Себестоимость	невысокая	невысокая	Высокая: набор для 100 определений 3165,75 FTTC	Высокая: набор для 50 определений 2250,80 FTTC	Высокая: набор для 25 определений 1447,20 FTTC

исследуемом образце. “Чтение” препарата обычно более быстрое и чувствительность исследования более высокая (10-20 plasmodium/ μ l). Для выполнения исследования большую каплю крови помещают на стекло, затем дефибринируют спиральными движениями уголка другого стекла или конца пипетки. Кровь распределяется по поверхности площадью около 1,5 см², тщательно высушивается при комнатной температуре (для чего требуется около двух часов) или в микроволновой печи (2-3 мин.) [18]. Эритроциты лизируются дистиллированной водой или раствором сапонинов [19], а паразиты окрашиваются разведенным раствором Giemsa (pH 7,2) в течение 20-40 мин. Наряду с этой классической техникой, описаны различные варианты с предварительным концентрированием паразитов центрифугированием или ультрацентрифугированием [20]. В противовес более быстрому прочтению и более высокой чувствительности [21], метод толстой капли имеет главное затруднение в более сложном прочтении результата и идентификации вида плазмодиев, вследствие того, что эритроциты-хозяева исчезают (паразитемия оценивается числом Plasmodium на 200 лейкоцитов). Эти трудности требуют от лаборанта определенного опыта и длительной практики, что является исключительно редким для большинства французских лабораторий.

Tecm QBC® (Quantitative Buffy Coat)

Описанный в 1983 году [22], этот метод основывается на применении флуорохрома (акридина оранжевого), который окрашивает нуклеиновые кислоты, особенно кровяных паразитов, как это было показано с 1965 года [23]. Для анализа используется кровь в объеме от 40 до 60 μ l, которая набирается в капиллярный цилиндр, предварительно импрегнированный оксалатом натрия, гепарином, ЭДТА и акридином оранжевым. В капилляр перед центрифугированием помещается полистереновый поплавок, занимающий до 90% внутреннего диаметра цилиндра. Центрифугирование проводят в центрифуге для микрогематокрита в течение 5 мин при 5000 g, оно позволяет дифференцированно разделять элементы крови, собирать инвазированные эритроциты близко к лейкоцитарному слою и распределять их монослоем вокруг поплавка (гаметоциты или шизонты Plasmodium ovale, или Plasmodium vivax могут быть обнаружены в лейкоцитарном слое, или в полосе, разделяющей плазму и кровяные пластинки). Капиллярный цилиндр помещается в специальный штатив флуоресцентного микроскопа (ультрафиолетовая эмиссия до 350 нм, увеличение $\times$ 500 с иммерсией). Содержимое цилиндра изучается по всей длине в процессе трех последовательных оборотов. Ядро плазмодиев сильно флуоресцирует и окрашивается в зеленый цвет, тогда как цитоплазма бледно желтая, более или менее различимая. Подготовка исследования занимает 7-10 мин и для прочтения результата необходимо 5 мин. При проведении теста возможны ошибоч-

ные результаты, обусловленные недостаточным персональным опытом исполнителя и связанные с ошибками в различении между Plasmodium и непаразитарными элементами (скопления тромбоцитов, лейкоцитарные инфильтраты...). Порог чувствительности метода оценен неодинаково разными авторами: 2 Plasmodium/5 μ l [24], 4 Plasmodium/ μ l [25] или 130 Plasmodium/ μ l [26]. Являясь высоко чувствительным тест QBC®, не позволяет оценивать паразитемию и определять вид причинного плазмодия (исключая редкие случаи присутствия гаметоцитов Plasmodium falciparum, легко идентифицируемых по очень характерной форме). Невозможность определения вида плазмодия является основным ограничением метода, особенно значимым в прогностическом плане, в связи с тем, что только Plasmodium falciparum может вызывать тяжелые осложнения (церебральная малярия) со смертельным исходом, а также в терапевтическом плане, в связи с высоким риском развития резистентности к различным противомалярийным средствам.

Определение растворимых антигенов

С 1992 года Всемирной организацией здравоохранения определены приоритетными исследования по разработке простых и относительно недорогих методов быстрой диагностики и раннего лечения малярии для учреждений первичной медицинской помощи, расположенных в эндемичных районах [27]. Новые методы диагностики были созданы [28] и некоторые из них, в частности определяющие HRP II, специфичный для Plasmodium falciparum, уже имеют коммерческое распространение во Франции: ParaSight® (Becton Dickinson Microbiology Systems, Meylan, France) и ICT Malaria Pf® (ICT Diagnostics, Sydney, Australia, распространяемый лабораториями FUMOUZE, Levallois-Perret, France). Другой тест (Optimal®, Flow Inc., Portland, Oregon, USA), основанный на определении изоформ паразитарной LDH – и, следовательно, позволяющий специфично определить четыре вида плазмодиев, паразитирующих у человека [29-30], – коммерциализован в некоторых странах, но еще не утвержден во Франции.

Определение HRP II (ParaSight®, ICT Malaria Pf®)

Histidine Rich Protein II или HRP II – это плазмодийный гликопротеиновый антиген. Он выделяется на поверхность эритроцитов, инвазированных Plasmodium falciparum. HRP II секретируется в течение внутриэритроцитарного цикла с пиком концентрации в момент разрыва эритроцитов (шизонтов). Только бесполое формы Plasmodium falciparum выделяют этот гликопротеин [31]. Методы, позволяющие обнаруживать HRP II, основаны на принципе иммунохроматографии. Тест ParaSight® представляет собой нитроцеллюлозную полоску, на которой фиксированы моноклональные антитела класса IgG, направленные против синтетического пептида АНН – деривата HRP II. Эти тест-полоски могут храниться при комнатной

температуре. Тест прост в выполнении, проводится в течение 5-10 мин., для него используется цельная капиллярная или венозная кровь. Положительная реакция устанавливается по появлению полос преципитации более или менее интенсивно окрашенных в ярко-розовый цвет. Каждая тест-полоска имеет контрольную полосу с положительной реакцией. Тест ICT Malaria Pf[®] представляет собой пластину с тест-полоской импрегнированной моноклональными антителами класса IgM (может храниться при температуре до +4°C). Используется цельная кровь, выполнение теста еще более быстрое (3-5 мин.) и еще более простое, чем ParaSight[®].

Эти тесты стали предметом многочисленных публикаций, представляющих различные результаты исследований чувствительности и специфичности обсуждаемых методов, примененных у больных малярией (жителей эндемичных регионов и путешественников), одновременно с утвержденными методами диагностики (толстая капля, тонкий мазок и/или полимеразная цепная реакция – ПЦР) [32-38]. Эти данные касаются, прежде всего теста ParaSight[®], который получил коммерческое распространение во Франции раньше, чем ICT Malaria Pf[®]. Ретроспективный анализ результатов, опубликованный в 1996 ВОЗ [39], оценивает чувствительность ParaSight[®] как максимальную – до 96%, при наибольшем уровне паразитемии, определенной методами толстой капли или тонкого мазка, до 100 Plasmodium falciparum [Pf]µl. Чувствительность достигала 81,3% при уровне паразитемии между 10 и 100 Pf/µl и была ниже 74,6% при паразитемии меньше 10 Pf/µl. Это комплексное исследование определило общую чувствительность метода до 87% (с порогом определения при паразитемии от 40 до 60 Pf/µl). Отмечено, что тесты ParaSight[®] и ICT Malaria Pf[®] могут оставаться положительными в течение многих дней после проведенного антималярийного лечения, тогда когда паразиты уже элиминированы из крови и классические методы (толстая капля и тонкий мазок) дают отрицательные результаты. Определяемая тестом ParaSight[®] антигенемия может быть относительно длительной, в большинстве случаев до 3 дней после исчезновения паразитемии, но может обнаруживаться и до 28 дня [33]. Некоторые ложноположительные результаты теста ParaSight[®] возможны при наличии в крови ревматоидного фактора IgM анти-IgG [40], потому что иммуноглобулины фиксированные на тест полоске являются IgG. Риск получения ошибочных результатов отличался в зависимости от конкретных условий [37,40]. Он составлял, по нашим данным, от 3 до 5% и отсутствовал для теста ICT Malaria Pf[®], так как в нем использованы IgM [37]. Ложноположительные результаты наблюдались при воспалительном синдроме, флебитах или вирусных гепатитах. В то же время, эти тесты могут быть и ложноотрицательными [33, 35], даже при малярии вызванной Plasmodium falciparum. Это всегда были случаи, когда взятие

пробы производилось на стадии гаметоцита Plasmodium falciparum (HRP II секретируется только на бесполом этапе развития паразита) или тогда, когда заболевание было вызвано другими видами плазмодиев (не Plasmodium falciparum), которые этими тестами не определяются.

Комментарий

Начиная с 1993 года, мы систематически осуществляем диагностику малярии, используя ассоциированно (совместно) два метода – тест QBC[®], как способ быстрого обнаружения возбудителя, а также тонкий мазок для подтверждения и определения вида плазмодия и степени паразитемии. В течение более трех лет мы дополняем эти два метода систематическим определением плазмодийного HRP II тестом ParaSight[®]. Следовательно, по прошествии нескольких лет, после проведения многих сотен исследований, мы приобрели сегоднешний опыт комплексной диагностики этого заболевания.

В целом, значимость различных методов диагностики малярии может быть оценена только по отношению к методу тонкого мазка, как официально утвержденному. Как и все другие, этот метод, разумеется, имеет свои пределы, свои ловушки, свои причины ошибок, из которых важнейшими являются те, которые связаны с недостаточным персональным опытом исполнителя, “читающего” препараты. Определенными ограничениями обладает, разумеется, и тест QBC[®], хотя понятно, что риск ошибок (ложноотрицательных результатов), даже в руках малоопытного исполнителя, значительно меньший. Более вероятно возможность получения ложноположительных результатов, которых следует опасаться. С этой точки зрения, тест QBC[®] является хорошим средством диагностики элиминации возбудителя, а его значение в качестве первоочередного средства обнаружения плазмодиев достоверно подтверждено. Для выполнения теста QBC[®] необходимо оборудование (ультрафиолетовый микроскоп, центрифуга), требующее существенных затрат, часто недоступных для неспециализированных лабораторий. По нашим данным, тест QBC[®] обладает достоверностью метода тонкого мазка, с чувствительностью до 95% (с порогом обнаружения порядка от 80 до 100 Pf/µl) и специфичностью около 98%. Быстро и легко выполнимый, этот тест является первоочередным в биологической диагностике малярии. Его результаты должны быть обязательно подтверждены и дополнены (диагностика вида плазмодия) с помощью исследования тонкого мазка.

Подверженный большому числу ошибочных результатов вследствие недостаточной или избыточной диагностики, метод определения плазмодийного HRP II тестом ParaSight[®] не должен ни в коем случае использоваться как единственное средство диагностики малярии. Он дополняет обычно используемые в лаборатории методы (тест QBC[®] и тонкий мазок), не улучшая существенно эффективность диагностики. Эти соображения за-

ставили нас на какое-то время отказаться от систематического применения теста ParaSight®. После 1997 года, мы вновь ввели тест ParaSight® в повседневную практику, в связи со многими случаями, доказавшими его дополнительные возможности в комплексе с тестом QBC® и тонким мазком.

Клинические примеры

Наблюдение 1.

Госпожа G., 28 лет, уроженка Берега Слоновой Кости, жаловалась на головные боли и лихорадку до 39°C, возникшие по возвращении во Францию после месячного пребывания в родной стране. Самостоятельно принимала мефлокин (Lariam®) в лечебных дозах. Появление головокружения, рвоты, выраженной слабости на фоне нормальной температуры и выраженной дегидратации заставило больную обратиться в отделение неотложной помощи Госпитально-университетского центра Гренобля. Тонкий мазок и тест QBC® дали отрицательные результаты, тогда как тест ParaSight® был положительным, что свидетельствовало в пользу малярии, вызванной *Plasmodium falciparum*, недавно леченной и излеченной. Это было подтверждено в ходе последующего наблюдения и улучшением состояния больной после проведения регидратации.

Наблюдение 2.

Госпожа M., 23 лет, габонка, прибыла во Францию около месяца назад. У нее обнаруживались признаки инфекции мочевыводящих путей и симптомы, указывающие на начинающийся приступ болотной лихорадки.

Тест QBC® был положительным, тогда как при длительном изучении тонкого мазка обнаружено только два трофозоида *Plasmodium falciparum*, которые было трудно идентифицировать. Диагноз малярии был установлен и проведено лечение мефлокином (Lariam®), в то время как тест ParaSight® был отрицательным. Через два дня тестом ParaSight® была выявлена антигенемия, при этом результаты исследования тонкого мазка и теста QBC® стали отрицательными, что подтверждает динамику результатов, присущих этим трем методам.

Наблюдение 3.

Господин X., центральноафриканец, прибыл во Францию после пребывания в родной стране, предъявлял жалобы на повышение температуры до 40,5°C с признаками, сопровождающими возникновение малярии. Исследование тонкого мазка дало отрицательный результат, тест QBC® выявил только лишь очень редкие элементы, вероятно, плазмодийные, но их идентификация была невоз-

можна. Таким образом, диагноз малярии был высоко вероятен, но без определения вида причинного плазмодия. Определенность внес резко положительный результат теста ParaSight®, без сомнения подтвердивший наличие *Plasmodium falciparum*, что позволило немедленно начать лечение мефлокином (Lariam®).

Заключение

Особенно велико искушение для неспециализированных исследователей заменить микроскопическую идентификацию вида *Plasmodium* другими тестами, не требующими большого персонального навыка. Наш опыт, основанный на сравнительной оценке различных лабораторных методов диагностики малярии, подтверждает риск ошибочных заключений (ложноположительных и ложноотрицательных), и мог бы повлечь за собой исключительное использование тестов, обнаруживающих антигенемии. Напротив, эти тесты необходимо рассматривать только как дополнительные по отношению к другим методам диагностики. Основными способами диагностики неоспоримо являются тест QBC® и метод тонкого мазка. Первый метод позволяет быстро обнаруживать инвазию, но его результаты должны быть обязательно подтверждены и уточнены (определение вида *Plasmodium*) исследованием тонкого мазка. Определение HRP II (ParaSight®) может полезно дополнить два основных метода, в частности, идентифицировать *Plasmodium falciparum*, а также осуществить диагностику *a posteriori* синдрома, расцененного как малярия и пролеченного без какого-либо биологического подтверждения диагноза. Практически, эта вторая потребность в применении теста ParaSight® оказывается гораздо более значимой, чем это представляется. У больного, возвратившегося после пребывания в эндемичной зоне, очень часто любой приступ лихорадки расценивают как малярию и начинают лечение без определенно установленного диагноза. Через 48 часов неудача с лечением заставляет выдвинуть гипотезу о резистентности к антималярийным препаратам. Зачастую, только спустя много дней иная причина, чем болотная лихорадка, проявляет себя, но уже со всеми последствиями, которые может повлечь за собой столь запоздалая диагностика. Это именно тот вариант ошибки, которого помогает избежать "тест на полоске" (ParaSight®), если его применить через 2-3 дня после лечения. В целом, обнаружение HRP II, следовательно, дополняет другие методы исследования, но не является, как бы ни привлекала простота его выполнения, методом первого порядка диагностики болотной лихорадки.

LE DIAGNOSTIC DU PALUDISME DANS LES REGIONS NON ENDEMIQUES. VALEUR, LIMITES ET COMPLEMENTARITE DES METHODES ACTUELLES

Marie Pierre Brenier-Pinchart, Claudine Pinel, Renée Grillot, Pierre Ambroise-Thomas

(Département de Parasitologie-Mycologie Médicale et Moléculaire. Centre Hospitalier Universitaire. B.P. 217. 38043 Grenoble Cédex 9. France Tirés-à-part: Dr. Marie-Pierre BRENIER-PINCHART, adresse ci-dessus. Tél. 04 76 76 54 90. Fax 04 76 76 56 60)

Résumé. Le diagnostic biologique de paludisme est une urgence médicale d'importance vitale, et on observe chaque année en France plus de 5000 cas de paludismes importés. L'examen d'étalements minces de sang fixé et coloré demeure la technique de référence, mais elle exige une expérience personnelle dont ne disposent pas tous les biologistes praticiens. La tentation est donc de la remplacer par d'autres méthodes plus simples (QBC® test) ou qui n'exigent pas de compétences particulières (tests à la bandelette de détection d'antigènes plasmodiaux ParaSight® et ICT Malaria Pf®) mais qui sont exposées à plusieurs causes d'erreur. Ces différents tests doivent donc être considérés comme complémentaires et si possible simultanément mis en oeuvre, la meilleure séquence étant: test QBC® - étalement mince - détection d'antigènes plasmodiaux (tests ParaSight® ou ICT Malaria Pf®)

Depuis longtemps, le paludisme n'est plus endémique en France Métropolitaine et il ne persiste que dans certains D.O.M.-T.O.M. (Guyane Française, Mayotte et peut-être Guadeloupe) [1]. Cependant, plus de 5000 cas de paludismes importés sont annuellement observés dans notre pays, chez des touristes ou chez des immigrants contaminés outremer [2]. Ce diagnostic est généralement très urgent et d'importance vitale. Le paludisme à *Plasmodium falciparum* peut en effet, être mortel, en particulier chez des sujets non prémunis (ce qui est évidemment le cas de la plupart des touristes) ou lorsque le diagnostic et le traitement sont tardifs.

Pendant de nombreuses décennies (en fait, depuis la découverte des *Plasmodium* par LAFERAN en 1880), le diagnostic biologique de paludisme reposait sur l'examen microscopique d'étalements minces ou de gouttes épaisses préalablement colorés par la méthode de May Grunwald Giemsa (MGG). Ce diagnostic purement morphologique est facile chez les sujets très parasités. Il est au contraire difficile en cas de faibles parasitemies, surtout si ne sont présentes que des formes atypiques compliquant l'identification précise de l'espèce plasmodiale en cause (ce qui est essentiel d'un point de vue aussi bien pronostique que thérapeutique). En outre, pour affirmer que l'examen au microscope est négatif, il est indispensable de poursuivre la lecture des lames pendant un temps suffisant (30 min. pour un étalement mince, d'après les normes de l'OMS). Il s'agit d'une contrainte qui est, en pratique, rarement respectée.

Ces difficultés ou ces contraintes sont particulièrement importantes pour des biologistes non spécialisés, ce qui est généralement le cas en France métropolitaine. Or, depuis quelques années, sont proposées de nouvelles méthodes. Il s'agit de techniques de concentration suivies de coloration par un fluoro-chrome et observation en microscopie à fluorescen-

ce (Quantitative Buffy Coat ou QBC®) ou encore de la recherche d'antigènes plasmodiaux solubles (Histidine Rich Protein II ou HRP II) ou d'une enzyme plasmodiale (Lactate Deshydrogénase Parasitaire ou pLDH).

En nous basant sur une expérience de plusieurs années [3-5], c'est à l'évaluation comparée de trois de ces méthodes (étalement mince, QBC®, détection de HRP II par le test ParaSight®) que nous nous attacherons ici, d'un point de vue très pratique. En revanche, nous excluons de cette étude la sérologie, la biologie moléculaire et la recherche de la pLDH. En effet, si la sérologie du paludisme est la seule technique actuellement applicable à la prévention du paludisme post-transfusionnel [6,7] ou à certaines études épidémiologiques [8], notamment par immunofluorescence, elle ne présente pas d'intérêt diagnostique en raison de la très longue persistance des anticorps anti-*Plasmodium*. La biologie moléculaire peut être précieuse pour des contrôles post-thérapeutiques (distinction entre éventuelles rechutes et néo-contaminations) [9], ou bien, dans l'avenir, pour la prévention du paludisme post-transfusionnel [10], mais ses applications diagnostiques pour le paludisme sont encore limitées [11-13]. Enfin, nous n'envisagerons pas les résultats obtenus par détection des isoformes de la pLDH. Ce test, déjà disponible dans plusieurs pays étrangers pour le diagnostic de *Plasmodium falciparum* [14,15] et bientôt pour celui des 3 autres espèces plasmodiales parasites de l'homme, n'est en effet pas encore enregistré en France.

Méthodes disponibles (Tableau 1)

Examens au microscope d'étalements minces ou de gouttes épaisses fixés et colorés (GIEMSA)

Il s'agit des techniques de référence. Le prélèvement est constitué de quelques gouttes de sang re-

Tableau 1.

Caractéristiques des principales techniques utilisables en pratique pour le diagnostic biologique du paludisme

	Goutte épaisse	Frottis mince	QBC® malaria	Détection d'antigènes solubles	
				ParaSight®	ICT Malaria Pf®
Temps de réalisation	2 h-2 h 30	20-30 min.	10 min.	5-10 min.	< 5 min
Temps de lecture	Long	Long	rapide	instantanée	instantanée
Facilité de lecture	Difficile	Parfois difficile	assez facile	très facile	très facile
Diagnostic d'espèce	oui	oui	non	P. falciparum seulement	P. falciparum seulement
Calcul de la parasitémie	oui	oui	non	non	non
Équipement particulier	Lames et microscope optique	Lames et microscope optique	Microscope à fluorescence et objectif spécial (×50 immersion)	non	non
Enregistrement A.F.S.S.A.P.S.	/	/	oui (Becton Dickinson)	oui (Becton Dickinson)	oui (Fumouze)
Coût	faible	faible	élevé Trousse de 100: 3 165,75 FTTC	élevé Trousse de 50: 2 250,80 FTTC	élevé Trousse de 25: 1 447,20 FTTC

cueillies par piqûre au vaccinostyle au doigt, au lobe de l'oreille ou, chez les jeunes enfants, au talon. Les avis diffèrent sur le moment le plus favorable à ce prélèvement (avant la survenue de l'accès, ou, au contraire, au moment du pic thermique). Pour le frottis mince, une goutte de sang est étalée sur une lame porte objet soigneusement dégraissée. Une fois séché, cet étalement est fixé au méthanol absolu puis coloré par une solution de Giemsa. Le temps de réalisation est de 30 à 40 min. la qualité du frottis et celle de la coloration sont deux éléments essentiels pour permettre une lecture correcte au microscope. Un étalement de mauvaise qualité, non monocellulaire, est "illisible". Un étalement mal coloré (trop clair, trop foncé ou avec des dépôts de colorants) est difficile à "lire" et peut être à l'origine de résultats erronés. L'examen se fait à l'immersion avec un objectif 100 (grossissement ×700 à ×1000) par l'observation de 50 à 100 champs microscopiques, ce qui nécessite environ 10 min. [16] (30 minutes avant de pouvoir affirmer la négativité) et permet la détection d'une parasitémie-seuil d'environ 150 parasites/μl [17]. Ce seuil est évidemment fonction du nombre de champs examinés et surtout de l'expérience du microbiologiste (la parasitémie est normalement exprimée en pourcentage d'hématies parasitées). L'examen du frottis mince permet, et c'est essentiel, d'identifier la ou les espèce(s) plasmodiale(s) en cause, à partir de critères morphologiques précis.

Cette technique est de loin la plus utilisée. Pour l'ensemble des cas déclarés au Centre National de Référence pour les Maladies d'Importation (CNRMI), plus de 95% sont diagnostiqués par le frottis mince, seul (50%) ou associé à la goutte épaisse (34,4%) ou au QBC® (11,3%).

La goutte épaisse reste la technique de référence pour l'OMS. Elle permet une "concentration" des *Plasmodium* éventuellement présents dans l'échantillon examiné, si bien que la lecture en est normalement plus rapide et la sensibilité plus élevée (10 à 20

Plasmodium/μl). Pour sa réalisation, une grosse goutte de sang est déposée sur lame puis défibrinée par un mouvement en spirale à l'aide du coin d'une autre lame ou d'une pipette. Le sang ainsi étalé sur une surface d'environ 1,5 cm² doit être séché complètement à température ambiante (ce qui peut nécessiter environ 2 heures) ou dans un four à micro-ondes (en 2 à 3 minutes) [18]. Les hématies sont alors lysées par l'eau distillée ou par une solution de saponine [19] et les parasites sont colorés au Giemsa en solution aqueuse (eau tamponnée à pH 7,2) pendant 20 à 40 min. À partir de cette technique classique, diverses variantes ont été décrites avec, notamment, la concentration préalable en parasites par centrifugation ou cytocentrifugation [20]. En contrepartie d'une lecture plus rapide et d'une sensibilité plus élevée [21], la goutte épaisse présente l'inconvénient d'une lecture plus difficile, puisqu'il convient de repérer et d'identifier des *Plasmodium* dont les hématies-hôtes ont disparu (la parasitémie est déterminée par le nombre de *Plasmodium* pour 200 leucocytes). Ceci nécessite une certaine expérience et une longue pratique, ce qui est exceptionnellement le cas dans la plupart des laboratoires français.

Test QBC® (Quantitative Buffy Coat)

Décrite en 1983 [22], cette technique utilise une coloration par un fluorochrome, l'acridine orange, qui colore les acides nucléiques, notamment des parasites sanguicoles, comme cela a été montré dès 1965 [23]. L'examen porte sur un volume de sang de 40 à 60 μl recueillis dans un tube capillaire pré-imprégné d'oxalate de potassium, d'héparine, d'EDTA et d'acridine orange. Un flotteur en polystyrène occupant environ 90% du diamètre intérieur du tube est inséré dans le capillaire avant une centrifugation (5 min. à 5.000 g. dans une centrifugeuse à microhématocrites) qui permet la séparation différentielle des éléments figurés du sang, rassemble les hématies parasitées au

voisinage de la couche leucocytaire et les répartit en monocouche autour du flotteur (les gamétocytes ou les schizontes de *P. ovale* ou de *P. vivax* peuvent être retrouvés dans la couche leucocytaire ou dans la frange séparant plasma et plaquettes sanguines). Le tube capillaire est alors disposé sur un support spécial et directement examiné au microscope à fluorescence (émission UV à 350 nm à un grossissement $\times 500$ et à l'immersion). Le contenu du capillaire est examiné sur toute sa longueur, au cours de 3 rotations successives. Le noyau des *Plasmodium*, fortement fluorescent, est coloré en vert tandis que le cytoplasme, jaune pâle, est plus ou moins visible. 7 à 10 min. de préparation et 5 min. de lecture sont nécessaires à ce test dont l'apprentissage est en règle rapide et facile. Cependant, diverses erreurs sont possibles, en particulier par excès, avec la confusion, par des personnes peu entraînées, entre *Plasmodium* et éléments non parasitaires (plaquettes, granulations leucocytaires...). Le seuil de sensibilité est apprécié de façon variable selon les auteurs: 2 *Plasmodium*/5 μ l [24], 4 *Plasmodium*/ μ l [25], ou 130 *Plasmodium*/ μ l [26]. S'il est sensible, le test QBC[®] ne permet pas de déterminer la parasitémie ni l'espèce plasmodiale en cause (en dehors des rares cas où, par chance, sont présents des gamétocytes de *Plasmodium falciparum*, facilement identifiables par leur forme très particulière). L'impossibilité d'un diagnostic d'espèce est un important inconvénient puisque, sur le plan pronostique, seul *Plasmodium falciparum* peut entraîner des complications graves voire mortelles (neuropaludisme) avec, sur un plan thérapeutique un risque élevé de résistances à différents antipaludiques.

Détection d'antigènes solubles

C'est en 1992 que l'OMS a déclaré prioritaire la recherche et la mise au point de techniques diagnostiques rapides, simples et peu coûteuses permettant un diagnostic et un traitement précoce du paludisme, notamment dans des dispensaires de soins primaires en zones d'endémie [27]. De nouvelles méthodes diagnostiques ont donc été développées [28] et certaines de ces techniques détectant la HRP II, spécifique de *Plasmodium falciparum* sont déjà commercialisées en France: ParaSight[®] (Becton Dickinson Microbiology Systems, Meylan, France) et ICT Malaria Pf[®] (ICT Diagnostics, Sydney, Australie, distribué par les Laboratoires FUMOUZE, Levallois-Perret, France). Un autre test (Optimal[®], Flow Inc., Portland, Oregon, USA) basé sur la mise en évidence des isoformes des LDH plasmodiales – et par conséquent susceptible de détecter les quatre espèces de *Plasmodium* parasites de l'homme [29-30] – est commercialisé dans certains pays étrangers. Il n'est pas encore enregistré en France.

Détection d'HRP II (ParaSight[®], ICT Malaria Pf[®])

La Histidine Rich Protein II ou HRP II est un antigène plasmodial glycoprotéique. Il est exprimé à la surface des hématies parasitées par *Plasmodium falciparum* et il est sécrété durant le cycle intra-érythrocytaire avec un pic lors de la rupture des schizontes. Seules les formes asexuées de *P. falcipa-*

rum expriment cette glycoprotéine [31]. Les tests permettant la détection de la HRP II reposent sur le principe d'immunochromatographie. Le ParaSight[®] se présente sous la forme d'une bandelette de nitrocellulose sur laquelle est fixé un anticorps monoclonal IgG dirigé contre un peptide synthétique, l'AHH, dérivé de la HRP II. Ces bandelettes peuvent être conservées à la température ambiante. Le test est de réalisation facile, en 5 à 10 min., à partir de sang total prélevé par ponction capillaire ou par ponction veineuse. La positivité est affirmée par l'apparition d'une bande plus ou moins intense de précipité coloré en rose vif, chaque bandelette portant par ailleurs un témoin-contrôle positif. L'ICT Malaria P.f.[®] se présente sous la forme d'une carte support de bandelettes-test imprégnées d'un anticorps monoclonal IgM (qui doivent être conservées à +4°C). Effectué à partir de sang total, il est un peu plus rapide (3 à 5 min.) et encore plus simple que le ParaSight[®].

Ces tests ont fait l'objet de nombreuses publications, rapportant des sensibilités et des spécificités différentes, compte-tenu des patients étudiés (habitants de zones d'endémie ou voyageurs) et des techniques de référence utilisées (goutte épaisse, frottis mince et/ou PCR) [32-38]. Ceci est particulièrement vrai pour le ParaSight[®] qui a été commercialisé en France avant l'ICT Malaria P.f.[®] Une méta-analyse des résultats, publiée en 1996 par l'OMS [39], estimait la sensibilité du ParaSight[®] supérieure à 96% lorsque la parasitémie [évaluée sur goutte épaisse ou étalement mince] est supérieure à 100 *Plasmodium falciparum* (Pf/ μ l). Elle est de 81,3% pour une parasitémie comprise entre 10 et 100 Pf/ μ l et inférieure à 74,6% pour une parasitémie inférieure à 10 Pf/ μ l. Cette étude de synthèse dégage une sensibilité globale de 87% [avec un seuil de détection de l'ordre de 40 à 60 Pf/ μ l]. D'une façon générale, les deux tests ParaSight[®] et ICT Malaria P.f.[®] peuvent demeurer positifs plusieurs jours après un traitement antipaludique alors que tous les parasites ont été éliminés du sang et que les techniques classiques [étalement mince ou goutte épaisse] sont négatives. Avec le ParaSight[®], la persistance de cette antigénémie peut être relativement longue, dans l'ensemble supérieure à 3 jours après la disparition de la parasitémie mais peut atteindre jusqu'à 28 jours [33]. Certains faux positifs du ParaSight[®] peuvent être expliqués par la présence de facteurs rhumatoïdes IgM anti-IgG [40], puisque l'immunoglobuline monoclonale fixée sur la bandelette est une IgG. Ce risque d'erreur est très variable selon le contexte [37,40]. Il est de 3 à 5% d'après notre expérience et n'existerait pas avec ICT Malaria P.f.[®] puisque le monoclonal utilisé est une IgM [37]. Des faux positifs ont été également observés dans le cas de syndromes inflammatoires, de phlébites ou d'hépatites virales. Par ailleurs, ce test peut être faussement négatif [33,35], même pour les paludismes à *P. falciparum*. C'est toujours le cas lorsque le prélèvement contient uniquement des gamétocytes de *P. falciparum* (la HRP II est uniquement sécrétée par les stades asexués du parasite) ou bien lorsque l'infection est due à des espèces

plasmodiales autres que *P. falciparum* que ces tests ne permettent donc pas de dépister.

Commentaires

Depuis 1993, nous réalisons systématiquement le diagnostic de paludisme en associant deux techniques, le QBC[®] comme méthode de dépistage rapide et le frottis mince pour confirmation et détermination de l'espèce plasmodiale et de la parasitémie. Depuis plus de 3 ans, nous avons ajouté à ces deux méthodes une recherche systématique de la HRP II plasmodiale par ParaSight[®]. C'est donc avec un recul de plusieurs années, portant sur plusieurs centaines d'examenens que se fonde notre expérience actuelle.

Dans l'ensemble, la valeur des diverses méthodes ne peut être appréciée que par rapport à celle du frottis mince considéré comme technique de référence. Comme toutes les autres, cette technique a bien entendu elle aussi ses limites, ses pièges et ses causes d'erreur dont l'importance est d'autant plus grande que le biologiste qui "lit" les préparations n'est guère expérimenté. Les mêmes réserves s'imposent évidemment pour le test QBC[®], avec cependant la notion que, dans les mains de biologistes non spécialisés, le risque d'erreurs par défaut (faux négatifs) est faible et que c'est surtout la possibilité de faux positifs qui est à craindre. A cet égard, le test QBC[®] constitue donc un bon moyen de diagnostic d'élimination et son emploi comme test de dépistage, en première intention, est justifié, mais l'équipement qu'il nécessite (microscope UV, microcentrifugeuse) est un investissement important, souvent prohibitif pour les laboratoires non spécialisés. D'après nos observations, il dispose, *versus* l'étalement mince, d'une sensibilité de 95% (avec un seuil de détection de l'ordre de 80 à 100 Pf/ μ l) et d'une spécificité d'environ 98%. Rapide et facilement mis en oeuvre, ce test peut constituer, le premier temps très utile du diagnostic biologique du paludisme. Ses résultats doivent cependant être vérifiés et complétés (diagnostic d'espèce plasmodiale) par l'examen d'un frottis mince.

Exposée à plusieurs causes d'erreurs par excès ou par défaut, la recherche d'HRP II par le ParaSight[®] ne doit, en aucun cas être utilisée comme seul moyen de dépistage. Son addition aux méthodes normalement utilisées au laboratoire (QBC[®] et étalement mince) n'améliorerait pas nos performances diagnostiques, considérées dans leur ensemble, ce qui nous a fait un moment abandonner son usage systématique. Depuis 1997, nous l'avons réintroduit dans notre pratique quotidienne, à la suite de plusieurs cas montrant la complémentarité de cette méthode, du QBC[®] et de l'étalement mince.

Observation 1

Madame G..., 28 ans, ivoirienne, présente des céphalées et une fièvre à 39°C au retour d'un séjour d'un mois dans son pays d'origine. Elle s'automédique par la méfloquine (Lariam[®]) à doses curatives. L'apparition de vertiges, de vomissements et d'une importante asthénie, conduit cette malade devenue apyrétique mais très déshydratée, à consulter en urgence au CHU de Grenoble. Le frottis mince et le

test QBC[®] sont négatifs alors que le ParaSight[®] est positif, ce qui est bien en faveur d'un paludisme à *Plasmodium falciparum* récemment traité et guéri. C'est ce que confirment la suite de l'observation et l'évolution clinique ultérieure après réhydratation.

Observation 2

Madame M., 23 ans, gabonaise, est arrivée en France depuis environ 1 mois. Elle présente une infection urinaire associée à une symptomatologie évoquant un accès palustre. Le QBC[®] est positif ainsi que le frottis mince qui montre, après un long examen au microscope, seulement deux trophozoïtes de *P. falciparum* qui sont en outre difficiles à identifier. Le diagnostic est donc certain et un traitement par la méfloquine (Lariam[®]) est instauré, malgré un test ParaSight[®] négatif. Deux jours plus tard l'antigénémie (ParaSight[®]) se positive alors que frottis mince et QBC[®] se sont négativés, ce qui est bien conforme à la cinétique des résultats respectifs de ces trois tests.

Observation 3

Mr X., centrafricain, présente à son arrivée en France au retour d'un séjour dans son pays d'origine, une hyperthermie à 40,5°C avec des signes d'accompagnement évoquant un paludisme. Le frottis mince est négatif, le test QBC[®] ne montre au total que de très rares éléments probablement plasmodiaux, mais dont l'identification précise est impossible. Le diagnostic de paludisme est donc hautement probable mais sans qu'on puisse préciser l'espèce plasmodiale en cause. C'est cette précision qu'apporte le test ParaSight[®] dont la forte positivité traduit sans conteste un paludisme à *P. falciparum* et justifie la mise en oeuvre immédiate d'un traitement par la méfloquine (Lariam[®]).

Conclusion

Surtout pour des biologistes non spécialisés, la tentation est grande de substituer à l'identification microscopique des *Plasmodium*, d'autres méthodes ne nécessitant pas une pratique personnelle particulière. Notre expérience, basée sur l'évaluation comparative de ces différents tests, confirme les risques d'erreurs (faux positifs et faux négatifs) que peut entraîner l'emploi exclusif de méthodes détectant l'antigénémie. Au contraire, ces techniques doivent être considérées comme uniquement complémentaires des autres tests. La complémentarité la plus indiscutable concerne d'abord le QBC[®] et l'étalement mince, le premier test permettant un dépistage rapide mais qui doit être impérativement confirmé et précisé (diagnostic d'espèce plasmodiale) par la seconde méthode. La détection d'HRP II (ParaSight[®]) peut utilement compléter les deux tests précédents, en particulier pour identifier *Plasmodium falciparum* ou bien pour établir un diagnostic *a posteriori* d'un syndrome étiqueté "paludisme" et traité sans aucune confirmation biologique. En pratique, cette deuxième éventualité est malheureusement plus fréquente qu'on ne l'imagine. Chez un malade de retour d'un séjour en zones d'endémie, tout accès fébrile est trop souvent considéré comme probablement palustre et traité sans que le diagnostic soit formellement établi. Après 48 heures, l'échec du traitement fait alors évoquer l'hypothèse

d'une résistance aux antipaludiques. Ce n'est souvent qu'après plusieurs jours qu'une étiologie autre que palustre est finalement envisagée, avec toutes les conséquences que peut entraîner un tel retard diagnostique. C'est le type d'erreur que permet d'éviter le "test à

la bandelette" s'il est pratiqué dans les deux ou trois jours suivant le traitement. Au total, ce test est donc bien un complément des autres méthodes diagnostiques, et non pas, comme sa simplicité d'emploi le laisserait espérer, un test de dépistage de première intention.

Références

1. Poinsignon Y, Arfi C, Sarfati C, Farge-Bancel D, Raccourt C. Accès palustre au retour d'un voyage aux Antilles Françaises. Discussion du mode de transmission. *Méd Trop*, 1999; 59, 55-57.
2. Centre National de Référence pour les Maladies d'Importation, Institut Santé et Développement, Université Pierre et Marie Curie, Bulletin n°14, octobre 1998.
3. Ambroise-Thomas P, Pinel C, Pelloux H, Picot S. Le diagnostic du paludisme: actualités et perspectives. *Cahiers Santé*, 1993; 3, 280-284.
4. Pinel C, Faure O, Ambroise-Thomas P. Paludisme: complémentarité de deux méthodes de détection de *Plasmodium* en pratique hospitalière. *Ann Biol Clin*, 1993; 51, 129-132.
5. Brenier-Pinchart MP, Pinel C, Croissonnier A, Brion JP, Faure O, Ponard D, Ambroise-Thomas P. Diagnosis of malaria in non endemic country: interest of Parasight in routine clinical laboratory. *Am J Trop Med Hyg*: soumis pour publication.
6. Ambroise-Thomas P. Prévention of post-transfusion malaria. In *Blood Transfusion and Infectious Diseases*. Piccin Ed. Padoue, 1989, 261-274.
7. Décret n°95-195 du 16 février 1995 relatif aux analyses biologiques et test de dépistage des maladies transmissibles effectués sur les prélèvements du sang et ses composants.
8. Ambroise-Thomas P, Wernsdorfer W, Grab B, Bertagna P, Cullen J. Longitudinal sero epidemiological studies on malaria in Tunisia. *WHO Bull.*, 1976; 54, 355-367.
9. Ciceron L, Jaureguiberry G, Gay F, Danis M. Development of a *Plasmodium* PCR for monitoring efficacy of antimalarial treatment. *J Clin Microbiol* 1999; 37, 35-38.
10. Hang VT, Be TV, Tran PN, Thanh LT, Hien LV, O'Brine E, Morris GE. Screening donor blood for malaria by polymerase chain reaction. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1995; 89, 44-47.
11. Tham JM, Lee SH, Tan TMC, Ting RY, Kara UAK. Detection and species determination of malaria parasites by PCR: comparaison with microscopy and with ParaSight-F and ICT Malaria PF test in a clinical environment. *J Clin Microbiol* 1999; 37, 1269-73.
12. Postigo M, Mendoza-Leon A, Perez HA. Malaria diagnosis by the polymerase chain reaction: a field study in south-eastern Venezuela. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1998; 92, 509-511.
13. Zhong HJY. Evaluation of a colorimetric PCR-based assay to diagnose *Plasmodium falciparum* malaria in travelers. *J Clin Microbiol* 1999; 37, 339-341.
14. Piper R, Lebras J, Wentworth L, Hunt-Cooke A, Houze S, Chiodini P, Makler M. Immunocapture diagnostic assays for malaria using *Plasmodium* lactate dehydrogenase [pLDH]. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60, 109-118.
15. Piper RC, Vander Jagt DL, Holbrook JJ, Makler M. Malaria lactate dehydrogenase: target for diagnosis and drug development. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 90, 433-437.
16. Wery M. Diagnostic biologique du paludisme. In: Danis M, Mouchet J. *Paludisme*. Ellipses, Aupelf Ed. Paris, 1991, 111-127.
17. Makler CJ, Palmier C, Ager AL. A review of practical techniques for the diagnosis of malaria. *Ann Trop Med Parasitol* 1998; 92, 203-206.
18. Chevalier B, Cavallo JD, Baudet JM, Samson T, Gros P, Crenn Y, Meyran M. Diagnostic rapide du paludisme: le four à micro-onde. *Bull Soc Path Ex* 1992; 85, 223-225.
19. Gleason RM. An improved method for thick film preparation using saponin as a lysing agent. *Clin Lab Haem* 1997; 19, 249-251.
20. Petithory JC, Ardoin F, Ash LR, Vandmeulebroecke E, Galeazzi G, Dufour M, Paugam A. Microscopic diagnosis of blood parasites following a cytocentrifugation technique. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 57, 637-642.
21. Dowling MAC, Shut GT. A comparative study of thick and thin blood films in the diagnosis of scarcely malaria parasitemia. *WHO Bull*, 1966; 34, 249-267.
22. Wardlaw SC, Levine RA. Quantitative Buffy Coat analysis, a new laboratory tool functioning as a screening complete blood cell count. *JAMA* 1983; 5, 617-520.
23. Ambroise-Thomas P., Michel-Brun J., Despeignes J. Identification rapide des parasites sanguicoles par coloration à l'acridine orange et microscopie à fluorescence. *Bull Soc Pathol Exot*, 1965; 58, 630-639.
24. Moody AH, Hunt-Cooke A, Chiodini PL. Experiences avec le Becton Dickinson QBC® pour le diagnostic biologique du paludisme. *Cahiers Santé* 1990; 4, 289-297.
25. Rickman LS, Oberst R, Sangalang R, Culay JD, Long GW, Cabandan A, Smith JI, Hoffman SL. Rapid diagnosis of malaria by acridin orange staining of centrifuged parasites. *Lancet* 1989; 14, 68-71.
26. Parzy D, Raphenon G, Martet G, Nicolas P, Touze JE, Baudon D, Lecamus JL. Quantitative Buffy Coat [QBC test] Monofluo kit falciparum. Intérêt comparé dans le diagnostic rapide du paludisme. *Med Trop* 1990; 50, 97-102.
27. WHO. Ministerial conference on Malaria, Amsterdam, The Netherlands, 26-27 october, 1992. Geneva: World Health Organization, mimeographed document CTD/MEM/92.3.
28. Beadle C, Long GW, Weiss WR, Mc Elroy PD, Maret SM, Oloo AJ, Hoffman SL. Diagnosis of malaria by detection of *Plasmodium falciparum* HRP-II antigen with rapid dipstick antigen-capture assay. *Lancet* 1984; 343, 564-568.
29. Cooke AH, Chiodini PL, Doherty T, Moody AH, Ries J, Pinder M. Comparison of a parasite lactate dehydrogenase-base immunochromatographic antigen detection assay [OptiMAL®] with microscopy for the detection of malaria parasites in human blood samples. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60, 173-177.
30. Palmer J, Lindo JF, Klaskals WI, Quesada JA, Kaminsky R, Baum MK, Ager AL. Evaluation of the OptiMAL® test for rapide diagnosis of *Plasmodium*

- vivax and Plasmodium falciparum malaria. J Clin Microbiol 1998; 36, 203-206.
31. Horward RJ, Uni S, Aikawa M, Aley SB, Leech JH, Lew AM, Wellems TE, Renner J, Taylor DW. Secretion of a malaria Histidine Rich Protein [Pf HRP II] from Plasmodium falciparum infected erythrocytes. J Cell Biol 1986; 103, 1269-1277.
32. Humar A, Ohrt C, Harrington MA, Pillai D, Kain CA. ParaSight test compared with the polymerase chain reaction and microscopy for the diagnosis of Plasmodium falciparum malaria in travellers. Am J Trop Med Hyg, 1997; 56, 44-48.
33. Cavallo JD, Hernandez E, Gerome P, Plotton N, Debord T, Le Vagueresse R. Antigénémie HRP II et paludisme d'importation à Plasmodium falciparum: comparaison de ParaSight-F et de l'ICT Malaria P.f.. Méd Trop 1997; 57, 353-356.
34. Funk M, Schlagenhauf P, Tschopp A, Steffen R. MalaQuick® versus Parasight® as diagnostic aid in travellers' malaria. Trans Roy Soc Trop Med Hyg, 1999; 91, 268-272.
35. Gautret P, Rodier MH, Kauffmann-Lacroix C, Jacquemin JL. Diagnostic du paludisme: attention aux faux négatifs avec des réactifs sur bandelette. Presse Méd 1999; 28, 913-914.
36. Laferi H., Kandel K., Pichler H., False positive dipstick test for malaria. N Engl J Med, 1997; 337, 1635-1636.
37. Mishra B, Samantaray JC, Kumar A, Mirdha BR. Study of false positivity of two rapid antigens detection tests for diagnosis of Plasmodium falciparum malaria. J Clin Microbiol, 1999; 37, 1233.
38. Jelinek T, Grobusch MP, Schwenke S, Steidl S, von Sonnenburg F, Northdurft HD, Klein E, Loscher T. Sensitivity and specificity of dipstick tests for rapid diagnosis of malaria in non immune travelers. J Clin Microbiol 1999; 37, 721-723.
39. WHO. A rapid dipstick antigen capture assay for the diagnosis of falciparum malaria. Bull WHO, 1996; 74, 47-54.
40. Bartoloni A, Strihmeyer M, Sabatinelli G, Benucci M, Serni U, Paradisi F. False positive paraSight-F test for malaria in patients with rheumatoid factor. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 1998; 92, 33-34.

© ШУРЫГИНА И.А., МАЛОВ И.В., МАРАМОВИЧ А.С., КЛИМОВ В.Т., ЧЕСНОКОВА М.В. – УДК 616.9

ВЛИЯНИЕ ПЛАЗМИДЫ С МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССОЙ 82 MD НА КЛИНИЧЕСКИЕ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ПСЕВДОТУБЕРКУЛЕЗА

И.А. Шурыгина, И.В. Малов, А.С. Марамович, В.Т. Климов, М.В. Чеснокова.

(Россия. Иркутск. Государственный медицинский университет, ректор – акад. МТА и АН ВШ А.А. Майборода, кафедра инфекционных болезней, зав. – проф. И.В. Малов)

Псевдотуберкулез относят к числу заболеваний, обладающих выраженным полиморфизмом клинических проявлений. При анализе данных литературы мы обратили внимание на значительные различия в течении псевдотуберкулеза в различных регионах страны. Так, экзантема наблюдается от 35% [6] до 92-100% больных [12,14]. Гепатомегалия по данным разных авторов встречается от 18,2-27,6% [1] до 86% [10] наблюдений, увеличение размеров селезенки – от 9% [11] до 41% [6], желтуха – от 5,5% [13] до 57% [7]. Частота рецидивов заболевания составляет от 4,4-10,6% [3,16] до 35-48% [11,12].

Последние достижения в изучении биологии *Y. pseudotuberculosis* позволяют предположить, что различия в клинической картине заболевания могут определяться биологическими свойствами возбудителя, в частности его плазмидным спектром. В то время как роль плазмиды вирулентности с молекулярной массой 42-48 MD к настоящему времени изучена достаточно хорошо, значение других плазмид *Y. pseudotuberculosis* в реализации патологического процесса остается недостаточно выясненным. Особый интерес представляет плазида с молекулярной массой 82 MD, обнаруживаемая только у *Y. pseudotuberculosis* I се-

рвара и не встречающаяся у других представителей рода *Yersinia*. Приписываемая этой плазмиде способность вызывать вспышечную заболеваемость [5,18,19] оспаривается многими авторами [2,9]. В последнее время появились единичные данные об иммуносупрессивном действии рVM 82, полученные на экспериментальных моделях, хотя механизм этого действия еще не ясен [4,5,8,17].

На территории Иркутской области сложилось два очага псевдотуберкулеза, вызванных циркуляцией возбудителей с различным плазмидным составом: север области, где возбудитель имеет только одну плазмиду – 47 MD и юг, где возбудитель несет 2 плазмиды – 47 и 82 MD.

Цель исследования: изучить влияние плазмиды 82 MD *Y. pseudotuberculosis* на течение инфекционного процесса при псевдотуберкулезе.

Материалы и методы

Изучение клинической картины при псевдотуберкулезе проводилось в условиях вспышечной заболеваемости в период с 1987 по 1995 г. Комплектование групп осуществлялось методом сплошной выборки среди лиц обоего пола, не имеющих признаков сопутствующих заболеваний.