

SEED Hematologia

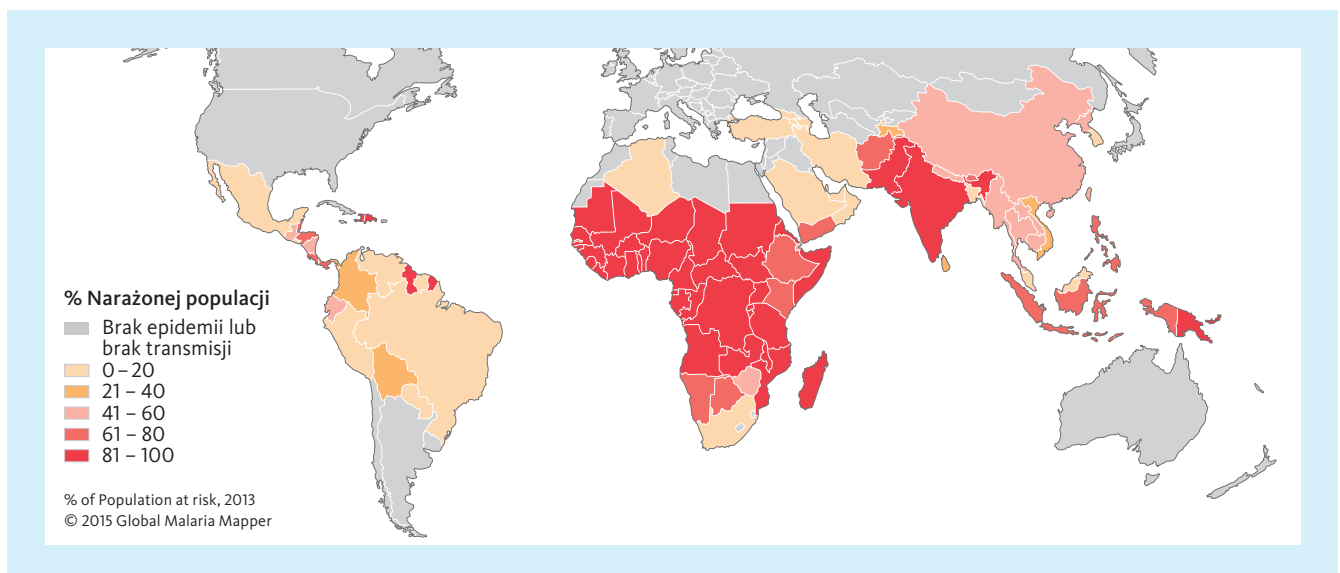


Malaria – problem globalny

Wprowadzenie

Malaria jest plagą ludzkości od czasów starożytnych i stanowi poważne zagrożenie dla około połowy ludności świata. Mimo, iż jest problemem głównie w regionach tropikalnych, to ze względu na turystykę i globalizację występuje ona coraz częściej także w obszarach nieendemicznych.

W 2012 roku potwierdzono 5161 przypadków malarii w 26 europejskich krajach. 85 % z tych przypadków odnotowano w pięciu krajach: Francja, Wielka Brytania, Niemcy, Hiszpania i Belgia, a 99 % z nich to zakażenia, do których doszło w czasie podróży [1].



Ryc. 1 Populacja narażona na zarażenie malarią, według danych z 2013 roku [3]

Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) szacuje, że na całym świecie, na zakażenie malarią i rozwój choroby narażonych jest 3,3 miliarda ludzi w 97 krajach i terytoriach (ryc. 1). 1,2 miliarda jest w grupie wysokiego ryzyka (> 1/1000 szansy na rozwój malarii w ciągu roku). Według ostatnich obliczeń w 2013 roku na całym świecie wystąpiło 198 milionów przypadków malarii (zakres niepewności 124 – 283 mln) a choroba ta doprowadziła do 584 tys. zgonów (zakres niepewności 367 – 755 tys.). Obciążenie jest największe w afrykańskim regionie WHO, gdzie około 90% wszystkich zgonów z powodu malarii występuje u dzieci poniżej 5 roku życia, co stanowi 78% wszystkich zgonów [2].

Wyzwania diagnostyczne

Diagnostyka i leczenie są powszechne w krajach, w których choroba występuje endemicznie. Niestety, w Europie lekarze prowadzący często mają trudności w doradzeniu środków profilaktyki lub postawieniu szybkiej i jednoznacznej diagnozy w przypadku wystąpienia infekcji. Niezaznajomieni z obrazem klinicznym, mogą źle interpretować podstawowe objawy kliniczne takie jak: gorączka, dreszcze, bóle głowy, bóle mięśni, powiększenie wątroby lub trzustki, nudności i wymioty, bóle brzucha i/lub biegunka, jako zakażenie grypowe lub inna podobna choroba. Jednoczesny brak historii pobytu w regionach endemicznych malarii nie wyklucza diagnozy malarii. Problemem w takich przypadkach jest jednak to, że malaria zazwyczaj nie jest uwzględniana w diagnostyce różnicowej przez większość lekarzy, którzy nie spotykali się wcale lub nie mieli zbyt wiele kontaktu z pacjentami cierpiącymi na malarię. Dlatego często właściwa diagnoza i leczenie rozpoczyna się dopiero po upływie znacznej ilości cennego czasu. W zależności od rodzaju patogenu, takie opóźnienia mogą być śmiertelne dla pacjenta.

Dlatego też, dla pacjenta jak i dla lekarza prowadzącego oraz laboratorium, sprawą najwyższej wagi jest to, aby wykorzystać wszelkie dostępne informacje w sposób, który umożliwi szybkie rozpoznanie i leczenie. Jest to szczególnie ważne w Europie, gdzie szybkie testy na malarię nie stanowią części standardowego programu badania pacjenta z objawami grypopodobnymi. Takie testy są wymagane tylko wtedy, gdy podejrzewa się zakażenie malarią. Oprócz objawów klinicznych i informacji o podróżach pacjenta, w niektórych przypadkach nieprawidłowości w badaniu krwi, mogą być pomocne w podjęciu decyzji o zleceniu testu na malarię lub wykonaniu rozmazu krwi („gruby rozmaz” i „rozmaz cienki”). Do przeprowadzenia pełnego zakresu badań niezbędny jest wykwalifikowany personel z dobrą wiedzą na temat morfologii oraz możliwości i ograniczeń analizatorów hematologicznych. W związku z tym należy wziąć pod uwagę, także czułość „grubego rozmazu” jako badania referencyjnego. Nawet w rękach eksperta, brak czułości w „grubym rozmazie” powoduje wyniki fałszywie ujemne [4].

Badania morfologii krwi są często wykonywane u pacjentów z malarią. Wnikliwa analiza wyników dostarczanych przez automatyczne analizatory hematologiczne wykazała, że kilka zmian,

głównie związanych z nieprawidłowościami białych krwinek (WBC) na skatergramie, było na tyle charakterystycznych, aby zasugerować zakażenie malarią u tych pacjentów, bez wiedzy na temat ich stanu klinicznego [5].

Malaria

Malaria jest wywoływana przez 5 gatunków pasożyta należącego do rodzaju *Plasmodium*. Cztery z nich – *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* oraz *P. ovale* – to ludzkie gatunki malarii, które przenoszone są z jednej osoby na drugą przez samice komara z rodzaju *Anopheles*. W dalszej części artykułu bardziej szczegółowo opisane zostaną *P. falciparum* oraz *P. vivax*, ponieważ występują one najczęściej i mają bardzo charakterystyczne różnice w odniesieniu do przebiegu choroby, rozmazu krwi i wyników z analizatora hematologicznego.

1. *Plasmodium falciparum*

Patogen ten jest najbardziej rozpowszechniony w Afryce i jest odpowiedzialny za większość śmiertelnych przypadków malarii [2]. Po tym jak człowiek zostaje ugryziony przez zainfekowaną samicę komara *Anopheles* (pośredniego gospodarza dla wszystkich rodzajów malarii), patogen atakuje hepatocyty. Tam, po czasie inkubacji wynoszącym 8 do 12 dni, dojrzewa do schizontów tkankowych, z których do krwiobiegu uwalnianych jest tysiące merozoitów. Te, atakują krwinki czerwone (RBC), tworząc pierścieniowe trofozoity, których nazwa pochodzi od sygnetowego wyglądu: kropki chromatyny i niebieskiego kręgu cytoplazmy pasożyta (patrz ryc. 2 i 3). Pierścieniowe stadium trofozoitu dojrzewa do schizonta, który pękając uwalnia kolejne merozoity, a te zarażają kolejne krwinki czerwone. Niektóre trofozoity różnicują się w gametocyty. Gametocyty nie wykazują dalszego wzrostu w ludzkim gospodarzu.

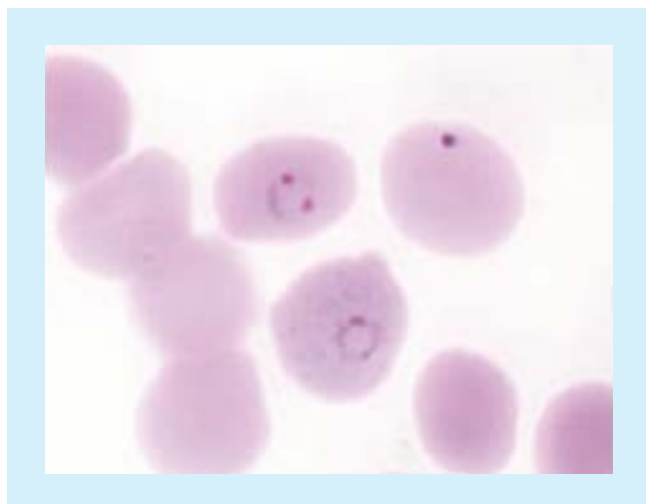
Podczas swojego wewnątrzkrwinkowego rozwoju bezpłciowego, trofozoit żywi się hemoglobina przez wchłanianie małych ilości cytoplazmy erytrocytów. Globina jest poddawana dalszemu trawieniu i rozkładowi na aminokwasy, wykorzystywane na potrzeby metaboliczne pasożyta. Jednak hem jest toksyczny dla pasożyta i dlatego jest agregowany do nierozpuszczalnego ciemnobrązowego kryształu zwanego hemozoiną, który może się gromadzić w zainfekowanych krwinkach czerwonych. Hemozoina jest uwalniana przez pęknięcie zainfekowanych krwinek czerwonych i jest aktywnie fagocytowana przez cyrkulujące monocyty i neutrofile, jak i makrofagi tkankowe wątroby i śledziony. Hemozoina aktywuje uwalnianie różnych mediatorów prozapalnych przez monocyty/makrofagi, w tym TNF- α , IL-1 β i chemokiny MIP-1 α i MIP-1 β , ale również odgrywa rolę inhibitora dojrzewania i funkcji niedojrzałych komórek dendrytycznych i może być odpowiedzialna za niektóre cechy tłumienia układu odpornościowego, charakterystycznego dla infekcji malarii [6]. Hemozoina jest także wytwarzana przez wszystkie inne gatunki *Plasmodium*. Dalsze rozmnażanie i rozwój patogenów powoduje pęknięcie krwinek czerwonych.

Uwolnienie pasożytów i ich produktów przemiany materii ostatecznie doprowadza do widocznych objawów klinicznych, takich jak: gorączka i dreszcze. Zazwyczaj okres inkubacji wynosi około 12 dni od momentu infekcji *P. falciparum*. Charakterystyczna dla obrazu klinicznego jest zmiana powierzchni krwinek czerwonych; która powoduje ich "przyklejanie" do komórek śródbłonka, wyścielającego światło naczyń. Właściwości adhezyjne erytrocytów podnoszą ryzyko niedrożności naczyń włosowatych, np. w mózgu (tak zwana „malaria mózgowa”) lub w nerkach, co powoduje niedotlenienie i poważne uszkodzenie narządów i jest głównym powodem wysokiej śmiertelności wywołanej infekcją tego rodzaju patogenu.

Jednocześnie, te same właściwości adhezyjne wpływają na to, że jedynie szczególne formy zainfekowanych krwinek czerwonych są wykrywane z krwi obwodowej- przede wszystkim wyżej wymienione formy pierścieniowe.

Oprócz tego, że w krwinkach czerwonych wykrywana jest forma pierścienia, w rozmazie krwi można zaobserwować również inne cechy:

1. Zainfekowane krwinki czerwone wykrywalne w rozmazie krwi nie są powiększone.
2. Zainfekowane krwinki czerwone, w przeciwieństwie do krwinek niezakażonych, zawierają wykrywalny, pasożytniczy kwas nukleinowy. Mogą się pojawić pierścienie z dwoma kropkami chromatyny (patrz środkowa komórka ryc. 2).
3. Możliwe jest występowanie kilku form pierścieniowych w pojedynczym erytrocycie (patrz ryc. 3).
4. Gametocyty pojawiają się we krwi obwodowej dopiero po około 4 tygodniach. Jednakże, są one rzadko widoczne. Ta forma płciowa będzie przekazana do gospodarza pośredniego i tam rozwijała się dalej.



Ryc. 2 Trofozoity wewnątrz krwinek czerwonych, formy pierścieniowe, zakażenie *P. falciparum*

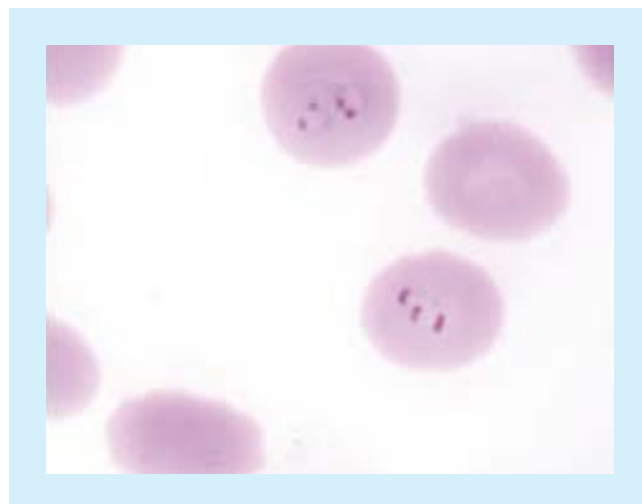
5. *P. falciparum* atakuje krwinki czerwone, osiągając parazytemię do ponad 50% i powoduje ciężką niedokrwistość. Jest to szczególnie ważne ze względu na fakt, iż liczba patogenów będzie znacznie wzrastać, a jednocześnie będzie się zmniejszać liczba krwinek czerwonych.
6. Charakterystyczną cechą jest pogłębiająca się niedokrwistość.
7. Typowe dla obrazu klinicznego są małopłytkowość i leukopenia oraz występowanie monocytosis. W bardzo późnym etapie, liczba leukocytów może ponownie wzrosnąć.

Na szczęście, po przewyciężonym zakażeniu spowodowanym przez *P. falciparum*, nie występuje ryzyko nawrócenia gorączki po miesiącach lub latach od początkowego zakażenia, ponieważ pasożyt nie pozostaje w wątrobie po pierwszym cyklu rozwojowym, w przeciwieństwie do *P. vivax* i *P. ovale*.

2. *Plasmodium vivax*

P. vivax geograficznie obejmuje większy obszar (głównie Azja, Ameryka Łacińska i niektóre części Afryki) niż *P. falciparum*. Ze względu na gęstość zaludnienia, zwłaszcza w Azji, to prawdopodobnie najbardziej rozpowszechniony ludzki pasożyt malarii. Zasadniczo cykl życiowy *P. vivax* jest bardzo podobny do *P. falciparum*. Jednak w obrazie klinicznym, malaria wywołana *P. vivax* nie jest tak poważna, jak malaria wywołana przez *P. falciparum*.

P. vivax preferencyjnie infekuje młodsze krwinki czerwone, co znacznie zmniejsza całkowitą ilość zainfekowanych erytrocytów i patogeniczność. Zakażone krwinki czerwone nie przylegają do komórek śródbłonka z powodu braku właściwości "przylegania". W związku z tym nie występują poważne komplikacje, widoczne w zakażeniu *P. falciparum*. Napady gorączki zdarzają się często, ale nie zawsze, w bardzo regularnych odstępach ok. 48 godzin, ze śródfazą praktycznie wolną od gorączki.

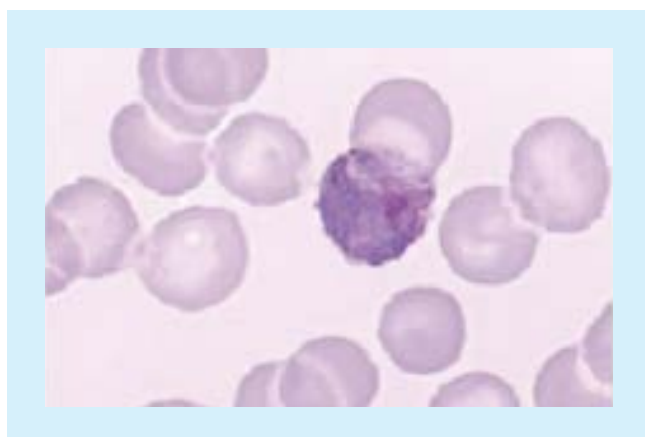


Ryc. 3 Dwie formy pierścieniowe *P. falciparum* w pojedynczej krwince czerwonej

Analiza krwi wykazuje także pewne różnice w stosunku do zakażenia przez *P. falciparum*:

1. Hemoliza młodych krwinek czerwonych stymuluje produkcję retikulocytów, a ich udział procentowy nieznacznie wzrasta w trakcie infekcji. Młode komórki są celem dla wolnych merozoitów we krwi.
2. Ponieważ krwinki czerwone nie przylegają do komórek śródbłonka naczyń krwionośnych, wszystkie formy dojrzewania znajdują się w krwinkach czerwonych we krwi obwodowej, t.j. trofozoity (formy pierścieniowe), schizonty i gametocyty (patrz ryc. 4).
3. *P. vivax* również powoduje rozpad hemoglobiny do hemozoiny, a ciemnobrązowe kryształy hemu, widoczne są jako struktury krystaliczne w zakażonych krwinkach czerwonych.
4. Erytrocyty zakażone przez *P. vivax* są powiększone- wraz ze wzrostem i dojrzewaniem patogenów wewnątrz tych komórek, zwiększa się ich wielkość.

P. vivax w uśpionej fazie (hypnozoit) może pozostać w wątrobie i powodować nawroty malarii kilka tygodni lub nawet lat później.



Ryc. 4 Gametocyty w RBC

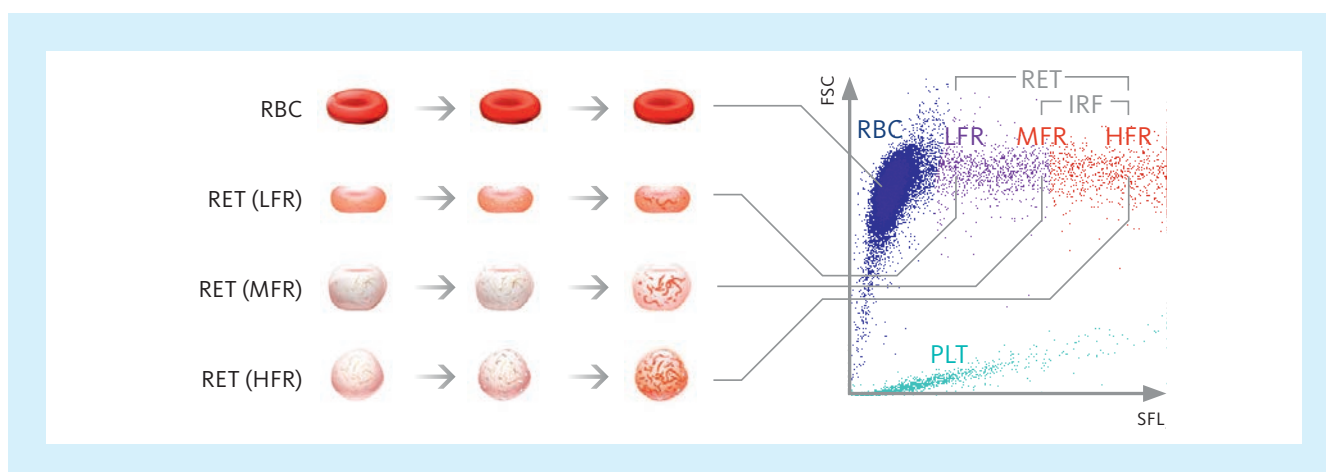
Technologia Sysmex oparta na fluorescencji – gdzie patogeny malarii mogą pojawiać się na skatergramach?

Prawie wszystkie, opisane dla obu patogenów malarii, cechy hematologiczne mogą być wykryte zarówno w rozmazie krwi, jak również przez analizatory hematologiczne. W analizatorach Sysmex można je wykryć przede wszystkim w dwóch kanałach pomiarowych, pod warunkiem, że infekcja jest wystarczająco silna: w kanale retikulocytarnym (kanał RET) i w kanale różnicującym WBC (zwanym dalej kanałem WDF). W obu kanałach do oznaczania kwasów nukleinowych używany jest specyficzny marker fluorescencyjny. Im wyższa zawartość wewnątrzkomórkowego DNA i RNA, tym większy jest wynikowy sygnał fluorescencji. W dalszej części opisano wspomniane kanały i podano informacje, gdzie i dlaczego zakażone *Plasmodium* krwinki czerwone znajdują się na skatergramach.

Kanał RET

Ilość RNA w retikulocytach jest jednoznacznym kryterium różnicującym dojrzałe krwinki czerwone i retikulocyty (ryc. 5). Ilość kwasu nukleinowego jest specjalnie oznaczona za pomocą fluorescencji opatentowanym znacznikiem w kanale RET. Im wyższa ilość kwasu nukleinowego w retikulocytach tym młodsze są komórki, a także większa jest intensywność sygnału fluorescencji mierzonego w kanale RET. Dojrzałe krwinki czerwone mają bardzo niski lub brak sygnału fluorescencji i z tego względu znajdują się bardzo daleko w lewo na osi x. Białe krwinki, które w tym kanale nie są poddane lizie, posiadają jądro komórkowe zawierające znacznie więcej kwasów nukleinowych niż retikulocyty i dlatego leżą poza skatergramem RET. Patogeny malarii również zawierają kwasy nukleinowe, które są znakowane i wykrywane w kanale RET.


P. falciparum oraz *P. vivax* mają bardzo różny wpływ na układ krwiotwórczy, dlatego ich pojawienie się, daje bardzo różny obraz na skatergramach RET. Ze względu na niską łączną liczbę

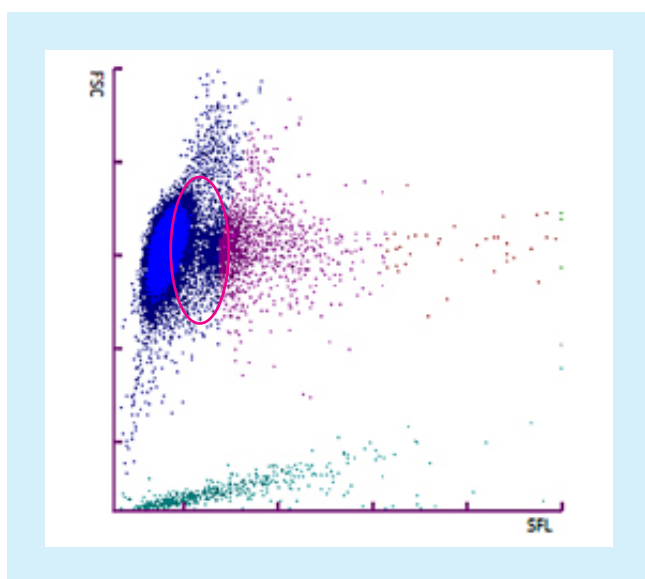


Ryc. 5 Schemat skatergramu RET

zakażonych czerwonych krwinek i początkową niską czułość wykrywania, zakażenie *P. vivax* może być niewykryte w kanale RET.

Zupełnie inaczej wygląda sytuacja w przypadku zakażenia *P. falciparum*. Odsetek zainfekowanych krwinek czerwonych jest relatywnie wysoki, a jednocześnie mogą wystąpić formy pierścieniowe. W rezultacie powoduje to znaczny wzrost liczby krwinek czerwonych ze zwiększoną zawartością kwasów nukleinowych.

Ryc. 6 przedstawia gdzie zlokalizowane są zakażone krwinki czerwone (oznaczenie ) na skatergramie RET. Cechuje je wyższy sygnał fluorescencji niż w przypadku komórek niezakażonych. Równocześnie komórki zainfekowane nie są powiększone, dlatego sygnał FSC nie jest zwiększony.



Ryc. 6 Skatergram RET u pacjenta z infekcją *P. falciparum*. Elipsa zaznacza obszar, w którym zainfekowane RBC interferują w prawidłowy rozkład komórek.

Komunikaty ostrzegawcze generowane przez kanał RET

Wszystkie obecnie dostępne na rynku analizatory hematologiczne zostały zaprojektowane w celu ustalenia nieprawidłowości w morfologii krwi. Nie są jednak przeznaczone do wykrywania specyficznych elementów wewnątrz komórek krwi. Czułość wiarygodnego diagnozowania zakażenia malarią – na przykład w postaci możliwości komunikatu ostrzegawczego takiego jak "Malaria?" przez analizator hematologiczny jest zbyt niska. Nadal niezbędny jest "gruby rozmaz". Odnosi się to również do kanału RET, który specyficznie wykrywa kwasy nukleinowe zawarte wewnątrz komórek krwi, ale nie jest w stanie odróżnić pasożytniczej formy kwasu nukleinowego, od specyficznego dla komórek DNA/RNA lub RNA retikulocytów.

W przypadku zakażenia malarią przez *P. falciparum*, które ma widoczny wpływ na skatergram RET, analizatory Sysmex zwykle wykazują następujące nieprawidłowości wyniku, łącznie z flagami:

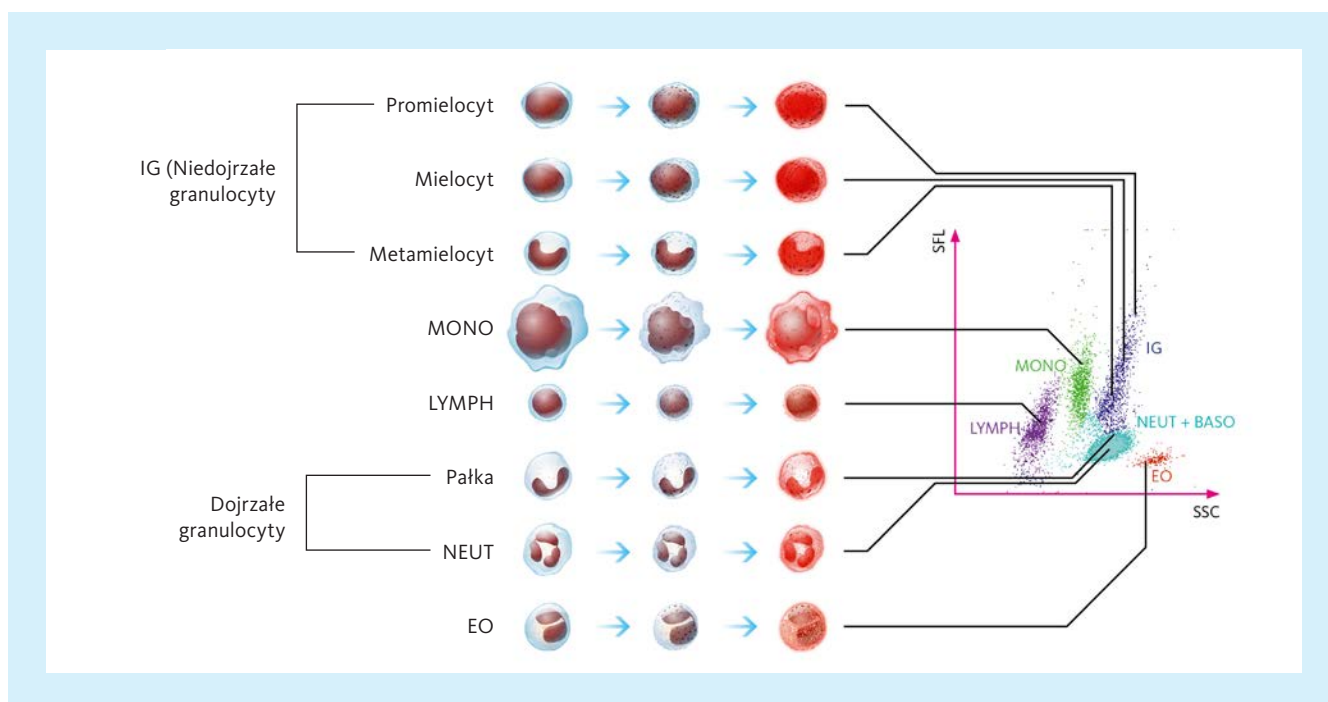
- Wyświetlany jest komunikat ostrzegawczy RET "Abn scattergram", ponieważ nie może być wykonane wyraźne oddzielenie erytrocytów od populacji LFR.
- Analizator zlicza wszystkie krwinki czerwone zawierające RNA jako retikulocyty wykazując pseudoretikulocytozę.
- Znacznie zwiększona może być frakcja retikulocytów dojrzałych, o tzw. "niskim wskaźniku fluorescencji" (LFR). Liczba bardzo młodych retikulocytów - frakcji niedojrzałych retikulocytów (IRF) – jest niska lub prawidłowa, podczas gdy całkowita liczba retikulocytów jest znacznie podwyższona. Fizjologicznie taka retikulocytoza nie jest możliwa w przypadku prawidłowej produkcji komórek. Jednakże, nieprawidłowy układ tych parametrów może być spowodowany przez zakażenie *P. falciparum*.
- Liczba retikulocytów, a także odsetek LFR mogą być wykorzystane w celu zbadania, czy leczenie jest skuteczne w przypadku infekcji malarii. Liczba „retikulocytów”, wykrywana przez analizator powinna się znacznie zmniejszyć, jeśli spada zakażenie pasożytami w czerwonych krwinkach.

Kanał WDF

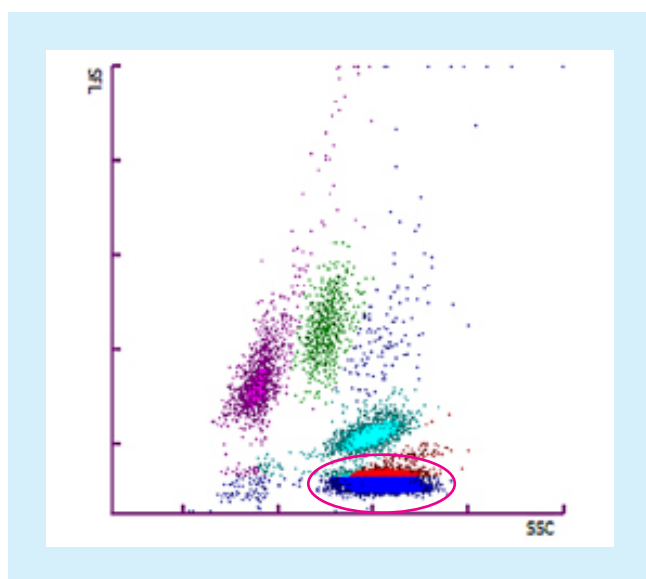
W kanale WDF leukocyty różnicowane są według zawartości kwasów nukleinowych i ich struktury wewnętrznej, niezależnie od ich wielkości (ryc. 7). Zapewnia to dokładne ustalenie miana limfocytów, monocytów, eozynofili, neutrofilii i niedojrzałych granulocytów.

Nawet, jeśli zakażone pasożytami malarii krwinki czerwone mają znacznie zwiększoną ilość kwasu nukleinowego versus krwinki niezainfekowane, to uzyskany sygnał fluorescencji jest wciąż znacznie mniejszy niż sygnał z jednej jądrzastej komórki, która zawiera DNA i daje dużo silniejszy sygnał fluorescencyjny. Zgodnie z tym, erytrocyty i retikulocyty, zakażone czy nie, można znaleźć na skatergramie WDF w obszarze "duchów" (ciemnoniebieski obszar poniżej limfocytów na ryc. 7).

Zwłaszcza w infekcji *P. vivax*, można zaobserwować, zwiększone rozproszenie boczne (SSC) i sygnał fluorescencji bocznej (SFL) w obszarze neutrofilii i/lub eozynofili na skatergramie WDF, kiedy obecne są odporne na lizę, wolne formy patogenów w postaci schizontów i gametocytów (ryc. 8). Nawet hemozoina może przyczynić się do zwiększenia sygnału światła rozproszonego bocznie i sygnału fluorescencji. W przeciwieństwie do tego, infekcja *P. falciparum* na skatergramie WDF objawia się mniej wyraźnie.



Ryc. 7 Schemat skatergramu WDF



Ryc. 8 Schizonty i gametocyty powodują wyraźny wzrost sygnału SSC, szczególnie w obszarze dla eozynofili (czerwone linie)

Komunikaty ostrzegawcze generowane przez kanał DIFF

W infekcji *P. vivax*, która ma widoczny wpływ na skatergram WDF, analizatory Sysmex zwykle wykazują następujące wyniki, w tym flagi generowane ze skatergramu WDF:

- Ponieważ skatergram WDF na ryc. 8 (czerwone linie) nie pokazuje wyraźnej separacji między obszarem "resztek" i eozynofili,

zostanie wyświetlona flaga "WBC Abn scattergram". Dolna część jest podzielona przez próg na dwie części: górna czerwona jest liczona przez analizator jako eozynofile, natomiast dolna niebieska jest pomijana przez analizator, ponieważ leży poniżej progu.

- Flagą "eozynofilia" jest konfigurowalna i może w tych przypadkach być pomocna w celu wykrycia pseudo-eozynofili.
- Często występuje flaga "Atypical Lympho?" spowodowana przez reaktywne limfocyty, które mogą pojawić się w czasie infekcji.

Wnioski

- Zakażenie *P. falciparum* i *P. vivax* powoduje wystąpienie różnych wzorców skatergramów:
- *P. falciparum* powoduje zmianę na skatergramie RET.
- *P. vivax* powoduje zmianę na skatergramie WDF.
- Są dostępne publikacje, w których autorzy wykorzystując analizatory Sysmex serii XE opisali pseudo-eozynofilię lub nieprawidłowe skatergramy WBC, jako skutek wystąpienia neutrofilii zawierających hemozoinę [5, 7, 8]. Chociaż na ogół w porównaniu z czułością konwencjonalnych metod diagnostycznych, takich jak gruby rozmaz barwiony metodą Giemsy, czułość analizatorów XE jest ograniczona, jego specyficzność jest wysoka.

Źródła

- [1] **Clinical and Laboratory Standards Institute (2006):** *Body Fluid Analysis for Cellular Composition. Approved Guideline. CLSI document H56-A* [ISBN: 1-56238-614-X].
- [2] **Thomas L (2007):** *Clinical Laboratory Diagnostics. Use and Assessment of Clinical Laboratory Results.* TH-Books Verlagsgesellschaft mbH
- [3] **Fleming C et al. (2015):** *Clinical relevance and contemporary methods for counting blood cells in body fluids suspected of inflammatory disease.* *Clin Chem Lab Med.* 53(11):1689.
- [4] **King Strasinger S et al. (2008):** *Urinalysis and Body Fluids.* Fifth Edition. ©2008 F. A. Davis Co.
- [5] **Oey RC et al. (2016):** *The diagnostic work-up in patients with ascites: current guidelines and future prospects.* *Neth J Med.* Oct; 74(8):330–35.
- [6] **Kam-Tao Li P et al. (2016):** *ISPD Guidelines/Recommendations. ISPD Peritonitis Recommendations: 2016 Update on Prevention and Treatment.* *Peritoneal Dialysis International.* Vol. 36, pp. 481–508.
- [7] **Labaere D et al. (2015):** *Detection of malignant cells in serous body fluids by counting high-fluorescent cells on the Sysmex XN-2000 hematology analyzer.* *Int J Lab Hematol.* 37(5):715.
- [8] **Xu W et al. (2016):** *Evaluation of Sysmex XN-1000 hematology analyzer for cell count and screening of malignant cells of serous cavity effusion.* *Medicine (Baltimore).* 96(27):e7433.
- [9] **Cho YU et al. (2015):** *Body fluid cellular analysis using the Sysmex XN-2000 automatic hematology analyzer: focusing on malignant samples.* *Int J Lab Hematol.* 37(3):346.