Случай выявления малярии с использованием современных методов лабораторной диагностики

А. Ю. Озерянская, врач клинической лабораторной диагностики отделения клинико-гематологических исследований¹

С. П. Казаков, д.м.н., нач. центра клинической лабораторной диагностики, гл. лаборант¹, зав. кафедрой иммунологии²

¹ФГБУ «Главный военный клинический госпиталь имени академика Н.Н. Бурденко» Минобороны России, г. Москва

²ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, г. Москва

Clinical case of malaria determining using modern laboratory diagnostics methods

A. Yu. Ozeryanskaya, S. P. Kazakov

Main Military Clinical Hospital n.a. N. N. Burdenko of the Ministry of Defense of Russia; Russian Medical Academy for Continuing Professional Education, Moscow, Russia

Резюме

Статья описывает клинический случай малярии у больной Х., 30 лет, которая поступила в лечебное учреждение МО РФ (г. Краснознаменск, Московская обл.) после поездки в Индию (Гоа). На основании ее жалоб и клинической картины был выставлен диагноз «острый лейкоз» с последующим переводом пациентки в гематологический центр ГВКГ им. Н. Н. Бурденко (далее — госпиталь). Усилиями врачей отделения клинико-гематологических исследований центра клинической лабораторной диагностики (ЦКЛД) госпиталя в течение короткого времени согласно лабораторным исследованиям больной заявлен правильный диагноз, о чем и сообщено специалистам гематологического центра. Пациентке своевременно была оказана необходимая медицинская помощь. В связи с редкой встречаемостью этого паразитарного заболевания (последний случай малярии нами диагностирован 10 лет назад) мы провели комплексное исследование с использованием различных лабораторных методов и современных анализаторов (гематологического и биохимического), что позволило вовремя распознать малярию — заболевание, которое редко встречается в Московском регионе и других регионах РФ.

Ключевые слова: малярия, клинический анализ крови, гематологический анализатор, микроскопия, трудности диагностики.

Summary

The article describes a clinical case of malaria in patient X., who was admitted to the medical institution of the Ministry of Defense. The patient was diagnosed with acute leukemia based on complaints and the clinical picture, followed by transferring the patient to the hematology centre of the Main Military Clinical Hospital n.a. N. N. Burdenko. In a short time, the patient was diagnosed with laboratory tests of the Department of Clinical and Hematological Research, and the diagnosis was reported to the specialists of the hematological centre. The patient was promptly provided with the necessary medical care. Due to the rare occurrence of this parasitic disease (the last case of malaria we diagnosed 10 years ago), we conducted a comprehensive study using various laboratory methods and modern hematological analyzers. All this made possible to recognize this disease, which is rare in the Moscow region, as well as in other regions of the Russian Federation, in a short period of time.

Key words: malaria, clinical blood test, hematological analyzer, microscopy, diagnostic difficulties.

Малярия распространена более чем в 90 странах, где проживает около 36 % общей человеческой популяции, из них 29 % — на территориях, где передача ее возбудителей отмечается на низком уровне. В последнее время количество случаев этого заболевания неизменно растет. По данным ВОЗ, ежегодно малярией заболевают от 300 до 500 млн человек и от 1,5 до 2,7 млн (90 % из них составляют дети младшего возраста) погибают от малярии.

Малярия (итал. *malaria*, от *mala*aria — дурной воздух; раньше полагали, что болезнь вызывается плохим воздухом) — это заболевания, обуславливающиеся внедрением в эритроциты человека различных видов одноклеточных паразитов плазмодия (*Plasmodium*). Выделяют три вида малярии с разными циклами деления: *Plasmodium malaria*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*.

Инфицирование малярией происходит при укусе зараженного комара, а также при переливании крови, зараженной этим паразитом.

Считается, что родиной малярии является Западная (*P. falciparum*) и Центральная (*P. vivax*) Африка. Молекулярно-генетические данные свидетельствуют, что предок плазмодия был свободноживущим простейшим, обладающим способностью к фотосинтезу и приспособившимся жить в кишечнике водных беспозвоночных. Также он мог жить в личинках первых кровососущих насекомых, которые появились 150–200 млн лет назад, и быстро приобрел возможность иметь двух хозяев. Древнейшие найденные окаменелости комаров с остатками малярийных паразитов имеют возраст 30 млн лет. С возникновением человека появились комары рода *Anopheles*, способные переносить малярийных паразитов от одного хозяина к другому.

Человек для паразита служит промежуточным хозяином, а окончательным переносчиком инфекции оказывается комар. При укусе зараженного комара вместе с его слюной паразит проникает в кровь и затем попадает в печень (печеночная стадия), далее — в эритроциты (эритроцитарная стадия). Развиваясь в эритроцитах, паразит проходит ряд превращений, хорошо различимых в тонком мазке.

CBC					DIFF				
Пар.	Данн	Ед.	LL	UL	Пар.	Данн	Ед.	LL	UL
WBC	5.55	$10^3/\mu\text{L}$			NEUT#	3.88	$10^3/\mu\text{L}$		
RBC	3.49	$10^6/\mu\text{L}$			LYMPH#	1.31	$10^3/\mu\text{L}$		
HGB	10.0	g/dL			MONO#	0.35	$10^3/\mu\text{L}$		
HCT	28.2	%			EO#	0.00	$10^3/\mu\text{L}$		
MCV	80.8	fL			BASO#	0.01	$10^3/\mu\text{L}$		
MCH	28.7	pg			NEUT%	69.9	%		
MCHC	35.5	g/dL			LYMPH%	23.6	%		
PLT	20	$10^3/\mu\text{L}$			MONO%	6.3	%		
RDW-SD	41.9	fL			EO%	0.0	%		
RDW-CV	14.4	%			BASO%	0.2	%		
PDW	---	fL			IG#	0.08	$10^3/\mu\text{L}$		
MPV	---	fL			IG%	1.4	%		
P-LCR	---	%							
PCT	---	%							
NRBC#	0.01	$10^3/\mu\text{L}$							
NRBC%	0.2	%							
RET					PLT-F				
Пар.	Данн	Ед.	LL	UL	Пар.	Данн	Ед.	LL	UL
RET%	0.96	%			IPF		%		
RET#	0.0335	$10^6/\mu\text{L}$							
IRF	36.7	%							
LFR	63.3	%							
MFR	20.7	%							
HFR	16.0	%							
RET-He	26.8	pg							

Рисунок 1. Данные анализатора Sysmex XN-1000 от 18.04.2018.

Рисунок 2. Скатерограмма анализатора Sysmex XN-1000 от 18.04.2018.

WBC Flag(s)	
Blasts/Abn Lympho?	
Left Shift?	
Atypical Lympho?	
RBC Flag(s)	
pRBC?	
PLT Flag(s)	
PLT Abn Distribution	
Thrombocytopenia	
Giant Platelet?	

Рисунок 3. Флагирующие анализатора Sysmex XN-1000 от 18.04.2018.

В процессе этой стадии образуются его бесполое и половое формы, и заканчивается все лизисом эритроцитов и выходом паразитов в кровь. Затем, если комар кусает зараженного человека, в его желудке происходит формирование зиготы из гамет паразита. При разрыве наружной оболочки желудка комара паразит вновь поступает в его слюнные железы.

Один цикл развития паразита занимает 72 часа для *P. malaria* и 48 часов для остальных видов возбудителя. Для *P. vivax* и *P. ovale* характерно сохранение в печени дремлющих форм (гипнозоитов), обуславливающих впоследствии отдаленные рецидивы малярии.

Представляем **клинический случай**, который вызвал затруднения в лабораторной диагностике, и по этой причине было определено иное заболевание. Только лишь последующий перевод больной в такое крупное многопрофильное учреждение, как госпиталь, позволил

врачам ЦКЛД в течение нескольких часов четко определить лабораторное подтверждение диагноза «малярия».

Больная X., 30 лет, поступила в гематологическое отделение с предположительным диагнозом «острый лейкоз». Жалобы при поступлении: лихорадка неясного генеза, профузная потливость, слабость.

После сбора эпидемиологического анамнеза выявлено, что женщина 10 дней назад вернулась из поездки в Индию (Гоа) и заболела одновременно с мужем.

При исследовании общего клинического анализа крови больной с микроскопией по методу Романовского-Гимзы был обнаружен малярийный плазмодий.

Автоматический анализ, полученный с прибора Sysmex XN-1000 (рис. 1), указывает на патологию эритроцитов (red blood cells, RBC) со снижением гемоглобина (hemoglobin, HGB) и расчетного показателя гематокрита (hematocrit, HCT).

Отмечается резкое снижение уровня тромбоцитов (platelets, PLT), что может быть связано с активацией сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза вследствие массивного гемолиза, а также токсическим действием паразитов.

Автоматический дифференциальный подсчет лейкоцитов отражает высокий процент нейтрофилов (neutrophil, NEUT%) с присутствием незрелых гранулоцитов (immature granulocytes, IG%) на фоне относительного снижения остальных фракций лейкоцитов.

В соответствии с принципами световой цитометрии, используя прямое светорассеяние (forward scatter, FSC), можно определить размер и форму клетки; боковое светорассеяние (side scattering, SSC) позволяет указать структуру и гранулярность клетки; боковая флуоресценция (side fluorescence, SFL) определяет содержание РНК/ДНК в клетках. С помощью каналов WDF (white blood cell differential channel, канал дифференцировки лейкоцитов) клетки дифференцируются согласно их внутренней структуре. В канале WNR (white cell nucleated channel, канал дифференцировки ядросодержащих клеток) клетки располагаются в зависимости от их размера.)

При прицельном изучении скатерограммы (рис. 2) WDF можно увидеть характерное раздвоение популяции нейтрофилов и базофилов, состоящее из двух частей (указано стрелкой). Фиолетовым выделена популяция эритроцитов, инфицированных паразитами. В норме такое разделение кластера клеток отсутствует и неизмененные эритроциты в этом канале не определяются, но в связи с возможным инфицированием паразитом анализатор принимает эритроциты за ядросодержащие и, следовательно, появляется дополнительное облако рассеивания на скатерограммах WDF.

На скатерограмме (рис. 2) WNR стрелкой указаны ядросодержащие эритроциты (нормобласты), которые могут присутствовать при ряде патологий, таких как анемия, гематологические заболевания. Но в данном случае необходимо дифференцировать их с эритроцитами, содержащими паразитов.

Анализ флагирующего (рис. 3), полученный с прибора Sysmex XN-1000, указывает на патологию.

Таблица 1
Результаты подсчета лейкоцитарной формулы методом световой микроскопии от 18.04.2018. Ув. 1000×

Показатель	Результат, %	Референсные значения, %	Примечание
Миелоциты	1	0	Повышен
Метамиелоциты	1	0	Повышен
Палочкоядерные нейтрофилы	34	1–5	Повышен
Сегментоядерные нейтрофилы	40	47–75	Снижен
Лимфоциты	15	19–37	Снижен
Моноциты	9	3–11	Норма

WBC (white blood cells, лейкоциты):

- Blast/Abn Lympho? — возможность присутствия бластов / аномальных лимфоцитов;
- Atypical Lympho? — возможность присутствия атипичных лимфоцитов;
- Left Shift — возможность сдвига лейкоцитарной формулы в левую сторону.

Наличие этих флагов позволяет предположить у пациентки патологию лейкоцитов и требует дифференцировки инфекционного от неопластического процесса.

RBC (red blood cells, эритроциты):

- pRBC (red blood cells with parasitic agent) — возможность наличия эритроцитов, инфицированных паразитами.

Представленный параметр встречается редко и свидетельствует о патологии эритроцитов, поэтому должен насторожить врача в отношении малярии.

PLT (platelets, тромбоциты):

- PLT Abn Distribution — аномальное распределение тромбоцитов;
- Thrombocytopenia — тромбоцитопения;
- Giant Platelet — возможность наличия гигантских тромбоцитов.

Данные показатели означают наличие у пациентки патологии количества, морфологии, формы и, возможно, функции тромбоцитов, связанных с активацией сосудисто-тромбоцитарного гемостаза, вследствие чего образуются агрегаты (конгломераты) тромбоцитов. В результате активации рецепторов тромбоцитов, с последующей их агрегацией и активным потреблением тромбоцитов, происходит компенсаторное замещение их пула свежими морфологически измененными пластинками, поступающими из костного мозга.

Тромбоцитопения потребления сопровождается образованием форм тромбоцитов, трудно поддающихся дифференцировке анализатором, или аномально гигантских тромбоцитов.

Оценка морфологии лейкоцитов и эритроцитов микроскопическим методом (окраска по Романовскому-Гимзе) позволила предоставить нижеприведенные данные (табл. 1).

У пациентки отмечается выраженный сдвиг лейкоцитарной формулы влево (присутствие молодых форм

Рисунок 4. Пораженные эритроциты с паразитами на стадии кольцевидного трофозойта (1) и полувзрослого шизонта (2). Эритроцит содержит зернистость Шюффнера (2). Ув. 1000×

Рисунок 5. Пораженные эритроциты с паразитами на стадии зрелого шизонта (1) и полувзрослого трофозойта (2). Ув. 1000×

нейтрофилов, резкое увеличение палочкоядерных нейтрофилов), что свидетельствует о массивном остром инфекционном процессе. Визуализируется малярийный плазмодий, вид *P. vivax*. Вид плазмодия хорошо определяется на основании различий в строении промежуточных стадий развития паразита. Шизонт имеет неправильную амёбовидную форму (рис. 5).

При этом у других видов плазмодия шизонт округлый или лентовидный, пораженные эритроциты

Рисунок 6. Пораженные эритроциты с паразитами на стадии полувзрослого трофозойта (1) и гаметоцита (2). Ув. 1000х.

Рисунок 7. Толстая капля. *Plasmodium vivax*. Зрелый трофозойт (1), гаметоцит (2), кольцевидный трофозойт (3). Ув. 1000х.

Рисунок 8. Толстая капля. *Plasmodium vivax*. Зрелый трофозойт (1), гаметоцит (2). Ув. 1000х.

увеличены в размере и содержат азурофильную зернистость Шюффнера (рис. 4), также имеет значение отсутствие характерных для *Malaria falciparum* форм гаметоцитов в виде полулуний — «сигар». У *P. vivax* гаметоцит округлый, занимает весь пораженный эритроцит (рис. 6).

Основываясь на данных микроскопии с учетом выявленных морфологических изменений, можно с высокой вероятностью предположить, что у пациентки имеется острый инфекционный паразитарный процесс, ассоциированный с малярией.

В соответствии с алгоритмом диагностики нами также было проведено исследование материала в толстой капле крови для оценки степени паразитемии. Толстая капля обладает значительным преимуществом перед тонким мазком: благодаря распределению значительного объема крови на меньшей площади за одно и то же время можно просмотреть в 20–40 раз большее количество крови, что увеличивает вероятность обнаружения паразитов (это важно при низкой степени паразитемии). Для этого толстую каплю окрашивали в нефиксированном состоянии (при этом эритроциты разрушаются, а плазмодии деформируются). На рис. 7 и 8 стрелками указаны различные стадии развития малярийного плазмодия.

Таким образом, анализ исследования толстой капли показал наличие малярийного плазмодия — *Plasmodium vivax* (18870 паразитов в 1 мкл крови).

Также нами были проведены дополнительные биохимические исследования у данной пациентки (табл. 2).

У пациентки отмечалось снижение общего белка за счет фракции альбуминов, что может быть как от недостаточного синтеза при поражении печени, так и при избыточном распаде белка по причине длительной интоксикации, ассоциированной с острым воспалительным процессом. Как следствие печеночной недостаточности, у больной обнаружено повышение аспартат-аминотрансферазы (АСТ), гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТ), что говорит о поражении печени и касается печеночной стадии размножения паразитов. Повышенный уровень общего билирубина — это проявление массивного распада эритроцитов, а повышение уровня креатинина может быть связано с токсическим повреждением сосудов клубочкового аппарата почек продуктами распада эритроцитов и малярийного плазмодия из-за массивного инфекционного процесса и разрушения эритроцитов. Все это приводит к возникновению клинических синдромов: гепатолиенального, надпеченочной желтухи, интоксикации. У пациентки также отмечалось нарушение углеводного обмена, которое выражалось повышением уровня глюкозы в результате расстройства функции поджелудочной железы, начинавшейся в итоге сбоя микроциркуляции вследствие активации сосудисто-тромбоцитарного гемостаза и массивного распада эритроцитов. Кроме того, выявлено нарушение ферментативной функции печени с повышением фермента лактатдегидрогеназы, которая предстает внутриклеточным ферментом, присутствующим как в эритроцитах, так и клетках печени. Ее повышение связано с массивным гемолизом эритроцитов, а также поражением клеток печени в силу инфицирования паразитами. Также отмечалось наличие повышенного уровня ферритина — белка, отвечающего за связывание железа, однако в данном случае его повышение ассоциируется с активацией гуморального звена врожденного иммунитета и, как белок острой фазы, свидетельствует о развитии острого воспалительного процесса, которым сопровождается паразитарная инфекция (малярия).

Выводы

В соответствии с алгоритмами диагностики малярии базовым методом обнаружения малярийного плазмодия является световая микроскопия. Гематологические анализаторы могут предположить эту инфекцию у больных, пребывающих в эндемичных регионах. Такое исследование можно проводить на гематологическом анализаторе с небольшим количеством паразитов в крови.

На описанном примере показана важность диагностики и интерпретации аппаратных показателей. Все это позволяет врачам-клиницистам своевременно поставить диагноз малярии, а специалистам клинической лабораторной диагностики иметь дополнительные критерии и методы, акцентирующие внимание в отношении данного заболевания.

Список литературы

1. Луговская С. А., Почтарь М. Е. Гематологический атлас. — М: Триада, 2011. 368 стр.
2. Клиническая лабораторная диагностика: в 2 т. Т. 2. / Под ред. профессора В. В. Долгова. — М: Лабдиаг, 2018. 624 с.
3. Всемирная организация здравоохранения. Всемирный отчет о малярии. Ж: 2018 / www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/ru/.
4. www.sysmex.ru

Для цитирования. Озерянская А. Ю., Казаков С. П. Случай выявления малярии с использованием современных методов лабораторной диагностики // Медицинский алфавит. Серия «Обзорение». — 2019. — Т. 3. — 32 (407). — С. 19-23.

Таблица 2
Результаты некоторых биохимических исследований
пациентки X. от 18.04.2018

Показатель	Результат	Референсные значения	Примечание
Общий белок, г/л	55	65–83	Понижение
Альбумин, г/л	28	39,70–49,40	Понижение
Креатинин, г/л	68	39,70–49,40	Повышение
Глюкоза, ммоль/л	6,7	4,11–5,89	Повышение
Общий билирубин, ммоль/л	31,2	5–25	Повышение
АЛТ, МЕ/л	27	0–41	норма
АСТ, МЕ/л	41	0–40	Повышение
ЛДГ, МЕ/л	922	240–480	Повышение
ГТТ, МЕ/л	89,1	5–61	Повышение
Железо, ммоль/л	9,7	5,83–34,50	норма
Трансферрин, г/л	2	2,00–3,60	норма
Ферритин, мкг/л	461	15–400	Повышение
Калий, ммоль/л	3,64	3,50–5,10	
Натрий, ммоль/л	139	134–155	

Компания «Рош» раскрывает гематологический портфель

Компания «Рош» представит новые данные по портфелю зарегистрированных и перспективных препаратов для лечения заболеваний крови на ежегодной конференции Американского общества гематологии (ASH), которая состоится 7–10 декабря в Орlando (США). Всего запланированы 70 абстрактов и 21 устный доклад, посвященные применению 10 препаратов компании в лечении 15 заболеваний крови, применяемых в отношении молекулярных мишеней.

«Мы рады представить на конференции ASH в этом году широкий спектр новых данных клинических исследований, которые демонстрируют достигнутый прогресс и нашу приверженность развитию в области гематологии, — сообщил Леви Гарруэй, главный медицинский директор и руководитель глобального подразделения по разработке лекарственных препаратов «Рош». — Благодаря строгому научному подходу к совершенствованию терапевтических решений мы продолжим использовать возможности для лечения агрессивных видов рака крови и редких гематологических заболеваний».

На конференции будут озвучены данные по двум биспецифическим антителам к CD20-CD3, которые активизируют Т-клетки для терапии Неходжкинских лимфом (НХЛ), — мосунетузмаб и CD20-TCB. Также в ходе пленарной сессии эксперты обсудят результаты исследования I/Ib-фазы GO29781, в котором изучается применение мосунетузмаба у пациентов с НХЛ, в том числе у тех, кто ранее получал CAR-T-клеточную терапию. На пленарной сессии будут представлены шесть лучших абстрактов, которые были выбраны программным комитетом ASH из числа поданных на мероприятие. Кроме того, эксперты представят новые предварительные данные по препарату CD20-TCB в комбинации с другими препаратами «Рош».

Также на ASH будут объявлены данные длительного наблюдения в исследовании Ib/II-фазы GO29365, которое посвящено изучению препарата полатузумаб ведотин (Полайви), первого в своем классе конъюгата «антитело-препарат» в комбинации с ритуксимабом (Мабтера) и бендамустином у пациентов с рецидивирующей или рефрактерной (P/P) диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой (ДВККЛ). На основе результатов этого исследования в июне 2019 года Управление по санитарному контролю за продуктами и лекарствами США одобрило полатузумаб ведотин по ускоренной процедуре. Кроме того, на

основании результатов этого исследования были поданы заявки на регистрацию препарата в другие органы здравоохранения по всему миру, в частности в России.

Кроме того, на ASH будут представлены данные по редким заболеваниям крови, включая гемофилию А и пароксизмальную ночную гемоглобинурию (ПНГ). Среди них — результаты исследования III фазы HAVEN 3, в котором изучается применение препарата эмицизумаб (Гемлибра) у пациентов с гемофилией А без ингибиторов к фактору свертываемости VIII. Анализ включает данные по влиянию эмицизумаба на здоровье суставов, а также дополнительные сведения об использовании заместительной терапии фактором VIII в случае возникновения кровотечений, требующих лечения у людей, получающих профилактическое лечение эмицизумабом в исследовании HAVEN 3, по сравнению с профилактикой фактором VIII в неинтервенционном исследовании. Кроме того, «Рош» представит данные исследования I и II фаз COMPOSER, в котором оценивается препарат кровалимаб у пациентов с ПНГ — угрожающим жизни заболеванием, при котором эритроциты разрушаются иммунной системой организма. Препарат кровалимаб, представляющий новое гуманизированное моноклональное антитело к C5, предназначен для блокирования системы комплемента, играющей ключевую роль в ПНГ.

Более 20 лет «Рош» занимается разработкой инновационных лекарственных препаратов, которые обеспечивают значительный прогресс в лечении злокачественных и неонкологических гематологических заболеваний. Компания обладает обширными знаниями и опытом в этой терапевтической области. В настоящее время она прикладывает большие усилия и инвестирует в разработку инновационных способов лечения пациентов, страдающих гематологическими заболеваниями. В портфеле препаратов представлены ритуксимаб (Мабтера), обинтузумаб (Газива), полатузумаб ведотин (Полайви), венетоклакс и эмицизумаб (Гемлибра). Исследуемые лекарственные препараты для лечения онкогематологических заболеваний включают: идасанутин — малую молекулу — антагонист взаимодействия MDM2 с p53; биспецифические антитела, действующие на Т-клетки, нацеленные на CD20 и CD3; атезолизумаб (Тецентрик) — моноклональное антитело, предназначенное для связывания с PD-L1; а также кровалимаб — анти-C5 — антитело, разработанное для оптимизации ингибирования комплемента при пароксизмальной ночной гемоглобинурии.