Mitt. Österr. Ges.
Tropenmed. Parasitol. 21 (1999)
107 - 112

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin, Medizinische Klinik, Klinikum Innenstadt der Universität München (1)
II. Medizinische Klinik (Infektionsmedizin), Charité/Campus Virchow Krankenhaus, Humboldt Universität, Berlin (2)

Sensitivität und Spezifität der Malaria-Diagnostik durch Teststreifen

T. Jelinek[1], M. P. Grobusch[2], S. Schwenke[2], S. Steidl[1], F. von Sonnenburg[1], H D. Nothdurft[1], E. Klein[2], T. Löscher[1]

Einleitung

Bedingt durch den weiterhin zunehmenden Ferntourismus ist Malaria auch in vielen Nicht-Endemiegebieten kein seltenes Krankheitsbild mehr. Aufgrund der relativ ausgedehnten Inkubationszeit der Erkrankung und der Kürze der durchschnittlichen Tropenaufenthalte wird geschätzt, dass es bei 90% aller infizierten Reisenden erst nach der Rückkehr zur Erstmanifestation einer Malaria kommt (8). Eine schnelle und zuverlässige Diagnostik ist insbesondere essentiell für die akkurate Behandlung der potentiell letal verlaufenden Malaria tropica. Die mikroskopische Untersuchung von Blutausstrich und „Dickem Tropfen" bleibt weiterhin die Methode der Wahl. Die korrekte Interpretation eines mikroskopischen Präparates setzt jedoch ausreichende Erfahrung voraus, die in Nicht-Endemiegebieten nicht immer in ausreichendem Maße vorhanden ist (7). Die Möglichkeit zur Durchführung eines einfachen und zuverlässigen Schnelltests könnte die Qualität der Malariadiagnostik bei Tropenrückkehrern mit Fieber in ihren Heimatländern entscheidend erhöhen.

Seit kurzem sind zwei schnell und einfach durchzuführende immuno-chromatographische Schnelltests für die Diagnose der Malaria tropica erhältlich. Beide Tests binden im Blut zirkulierendes Parasitenantigen mittels spezifischer Antikörper, die an die Membranoberfläche des Teststreifens fixiert sind. Hierbei weist ICT Malaria P.f.® (ICT Diagnostics, Sydney, Australien), der im deutschsprachigen Raum unter dem Namen MalaQuick® vertrieben wird, Histidin-reiches Protein 2 (HRP 2) von *P. falciparum* nach. Ein weiterer Test, OptiMAL® (Flow Inc., Portland, Oregon, USA), der derzeit noch aus den USA importiert werden muß, reagiert mit Parasiten-spezifischer Laktatdehydrogenase (pLDH). Um den potentiellen Nutzen dieser Schnelltests für die Malariadiagnose bei nicht-immunen Patienten zu evaluieren, wurde eine multizentrische Studie bei deutschen Tropenrückkehrern mit Fieber durchgeführt. Sensitivität und Spezifität der Tests wurden gegen mikroskopische Ergebnisse evaluiert. Bei divergierenden Ergebnissen wurde eine weitere Diagnostik mittels Polymerase-Kettenraktion (PCR) als Goldstandard durchgeführt.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Methoden Im Rahmen einer prospektiven Studie, die 3 poliklinische Ambulanzen sowie deren jeweilige Labors einschloß (II. Medizinische Klinik [Infektionsmedizin], Charité/Campus Virchow Krankenhaus, Humboldt Universität, Berlin sowie Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin und Klinikum Innenstadt, beide Universität München) wurden nicht-immune Tropenrückkehrer aus Malaria-Endemiegebieten mit Fieber (>37,5°C) rekrutiert. Vor Beginn einer spezifischen Therapie wurde von jedem Patienten eine Blutprobe zur mikroskopischen Untersuchung sowie zur Durchführung der Schnelltests und gegebenenfalls der PCR gewonnen. Blutausstriche und „Dicke Tropfen" wurden als negativ beurteilt, wenn in 200 Gesichtsfeldern (1000x) keine Plasmodien nachweisbar waren. Im Falle eines positiven Befundes wurde die Parasitämie als Prozentsatz der parasitierten Erythrozyten im Blutausstrich kalkuliert und dann unter Einbezug der individuellen Erythrozytenzahl/µl auf Parasiten/µl umgerechnet.

Beide Schnelltests, die in dieser Studie verwendet wurden, weisen Parasiten-spezifisches Antigen im Vollblut durch Bindung an spezifische, Membran-fixierte Antikörper und nachfolgende Farbreaktion nach. Im Falle eines positiven Befundes entsteht innerhalb von Minuten eine sichtbare Bande auf dem Teststreifen. Während ICT Malaria P.f.® mit HRP2 reagiert und somit ausschließlich zum Nachweis von *P. falciparum* eingesetzt werden kann, ist OptiMAL® so konstruiert, dass durch die Bindung Spezies-spezifischer Varianten der pLDH der Nachweis (und die Differenzierung) von *P. falciparum* und *P. vivax* möglich ist. Die Testanleitungen der Hersteller wurden in jedem Falle strikt befolgt. Die einzelnen Untersucher waren zum Zeitpunkt der Durchführung jeweils nicht über die Ergebnisse des parallelen Tests sowie der Mikroskopie informiert. Kam es zu divergierenden Ergebnissen zwischen Teststreifen und Mikroskopie, wurde eine PCR-basierende Methode zum sensitiven Nachweis selbst kleinster Mengen von Plasmodien-DNA eingesetzt. In diesem Fall wurden 10µl Vollblut auf Whatman™ #4 Filterpapier ausgetupft und getrocknet. Die DNA-Extraktion wurde mittels Chelex-Suspension durchgeführt (5). Spezies-spezifische Primer wurden zum Nachweis der einzelnen Plasmodienspezies eingesetzt (10).

Ergebnisse Bei 53 (22,9%) der 231 Patienten, die für die Studie rekrutierte wurden, konnte eine Malaria tropica mikroskopisch nachgewiesen werden. Weitere 13 (5,6%) Patienten waren mit *P. vivax* infiziert, einer (0,4%) mit *P. ovale* und 2 (0,9%) mit *P. malariae.* Die Ergebnisse beider Schnelltests für den Nachweis von *P. falciparum* im Vergleich zu Mikroskopie und PCR sind in Tabelle 1 dargestellt. In der hier untersuchten Studienpopulation, die aus nicht-immunen Patienten bestand, die sich in einer Vielzahl verschiedener Endemiegebiete infiziert hatten, zeigte ICT Malaria P.f.® im Vergleich zur Mikroskopie eine Sensitivität von 92,5% (95% Konfidenzintervall (CI) 87,2-95,8%) und eine Spezifität von 98,3% (95%CI 97,2-99,8%). Der positive Vorhersagewert (PPV) dieses Schnelltests lag bei 94,2%, der negative Vorhersagewert (NPV) bei 97,8%. Im Vergleich hierzu zeigte der OptiMAL® eine Sensitivität von 88,7% (95%CI 84,1-91,9%) und eine Spezifität von 99,4% (95%CI 96,4-100%), während PPV bei 97,9% und NPV bei 96,7% lagen. Alle diskordanten Ergebnisse wurden mittels PCR überprüft. Hiermit konnten 3 falsch positive und 4 falsch negative Ergebnisse beim ICT Malaria P.F.® bestätigt werden, während sich beim OptiMAL® ein falsch positives und 6 falsch negative Ergebnisse zeigten (Tab. 1). Von einer Probe mit einer Parasitämie von 20.000/µl (die wiederholt negativ bei beiden Teststreifen reagierte) abgesehen, lag die Parasitämie bei allen falsch negativen Proben unter 5.000/µl. In einem Fall, bei einem fieberhaften Rückkehrer aus Tansania, wurde die Diagnose einer Malaria tropica zunächst nur durch ein positives Ergebnis im ICT Malaria P.f.® gestellt – Mikroskopie und OptiMAL® waren zu diesem Zeitpunkt negativ, die Kontrolle mittels PCR ergab jedoch mehrfach den Nachweis von *P. falciparum*-DNA. Bei Wiedervorstellung 12 Stunden später, präsentierte sich der Patient mit einer jetzt mikroskopisch deutlich nachweisbaren Parasitämie von 0,5%, beide Schnelltests reagierten jetzt positiv. Kreuzreaktionen mit anderen Plasmodienspezies traten bei keinem der beiden Schnelltests auf.

Der auf dem Nachweis von Parasiten- und Spezies-spezifischer pLDH basierende OptiMAL®-Test weist außer *P. falciparum* auch *P. vivax* nach. Infektionen mit dieser Spezies traten bei einer

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Tabelle 1:

Nachweis von *P. falciparum* im Vergleich: Mikroskopie und PCR versus OptiMAL® und ICT Malaria P.F.® (MalaQuick®) (n=231).

		Mikroskopie/PCR	
Teststreifen	**Ergebnis**	**Positiv**	**Negativ**
OptiMAL®	Positiv	47	1
	Negativ	6	178
ICT Malaria P.f.®	Positiv	49	3
	Negativ	4	175

Tabelle 2:

Nachweis von *P. vivax* mittels Mikroksopie und OptiMal® (n=231).

	Mikroskopie	
OptiMal®	**Positiv**	**Negativ**
Positiv	8	0
Negativ	5	218

kleinen Gruppe von Patienten in dieser Studie auf (n=13), die Ergebnisse des Teststreifens gegenüber der Mikroskopie sind in Tabelle 2 dargestellt. Die Sensitivität des OptiMAL®-Tests zum Nachweis von *P. vivax* war 61,5%, die Spezifität lag bei 100% (PPV 100%, NPV 97,8%).

Diskussion

Einfach durchzuführende, schnelle und zuverlässige Teststreifen zum Malaria-Nachweis könnten die Diagnostik und somit die Einleitung der Therapie bei fieberhaften, nicht-immunen Tropenrückkehrern entscheidend verkürzen und somit zur Reduktion der Mortalität beitragen. Beide Schnelltests, die in dieser Studie untersucht wurden, wiesen *P. falciparum* mit hoher Sensitivität und Spezifität nach. Während der OptiMAL®-Test eine Sensitivität von 88,5% aufwies, erreichte ICT Malaria P.F.® 92,5%. Bei beiden Testkits fiel eine sehr hohe Spezifität von 99,4% bzw. 98,3% auf. Bei einem Patienten, der zunächst als mikroskopisch negativ klassifiziert worden war, wurde die Diagnose einer Malaria tropica zuerst durch einen positiven ICT Malaria P.f.®-Teststreifen gestellt. Hier zeigt sich der potentielle Nutzen dieser Methodik: ohne Schnelltest wäre die Infektion bei diesem Patienten möglicherweise bis zu einem weit späteren Zeitpunkt übersehen worden. Ähnliche Ergebnisse für Sensitivität und Spezifität liegen von Studien mit anderen Testskits zum Nachweis von HRP2 vor (2-4, 6). Der OptiMAL®-Test wurde zuvor lediglich in einer Studie bei einer kleinen Anzahl semi-immuner Patienten mit Malaria tropica in Honduras evaluiert: hier wurde eine nahezu gleiche Sensitivität wie in dieser Untersuchung berichtet (9). Eine deutliche Diskrepanz zeigte sich jedoch bezüglich des Nachweises von *P. vivax* durch OptiMAL®: während bei der in dieser Studie untersuchten Population eine Sensitivität von 61,5% bei einer Spezifität von 100% auffiel, wurde aus Honduras eine Sensitivität von 94% bei einer Spezifität von ebenfalls 100% berichtet. Offensichtlich muß hier eine größere Anzahl von Patienten untersucht werden, bevor dieser Testkit für den breiten Einsatz in der Diagnose der Malaria tertiana empfohlen werden kann. Von einer Blutprobe abgesehen, lag die Parasitämie bei allen falsch negativen Ergebnissen unter 5000/µl, somit läßt sich eine erniedrigte Sensitivität der Schnelltests bei niedriger Parasitämie ableiten. Ähnliche Daten sind für den OptiMAL®-Test aus Honduras bei semiimmunen Patienten berichtet worden (9). Die Beobachtung, dass die Blutprobe eines Patienten mit einer Parasitämie von 20.000/µl wiederholt negativ in beiden Schnelltests reagierte, ist jedoch besorgniserregend. Die Gründe hierfür sind unklar, jedoch sind ähnliche Probleme bereits von Feldstudien mit Schnelltests zum Nachweis von HRP2 berichtet worden (1, 4, 6).

Zusammenfassend läßt sich sicherlich aus den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung ableiten, dass Schnelltests zum Nachweis humanpathogener Plasmodien sicherlich eine potentiell hilfreiche Erweiterung der diagnostischen Mittel darstellen. Die Durchführung beider Testkits erwies sich als sehr einfach, daher wäre ihr Einsatz auch durch weniger trainiertes bzw. unerfahrenes Personal möglich. Es muß jedoch darauf hingewiesen werden, dass die Sensitivität beider Schnelltests zwar sehr hoch, aber eben doch unterhalb der Nachweismöglichkeiten der Mikroskopie lag. Selbst Infektionen mit hoher Parasitämie können in Einzelfällen durch Teststreifen-Diagnostik übersehen werden. Daher kann ein negativer Teststreifen nicht als Ausschlußkriterium einer Malaria gewertet werden. Weitere Einschränkungen im Gebrauch der Teststreifen sind fehlende Informationen über die Schwere der Infektion und eine mangelhafte Unterscheidung bei Mischinfektionen mit mehr als einer Plasmodienspezies. Die zwingende Notwendigkeit einer mikroskopischen Untersuchung bei jedem einzelnen Patienten mit Malariaverdacht wird durch die derzeit erhältlichen Teststreifen-Diagnostik nicht aufgehoben.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Zusammenfassung

Fragestellung: Die zügige und korrekte mikroskopische Diagnose einer Malaria in Nicht-Endemiegebieten hängt wesentlich von der Erfahrung des involvierten Laborpersonals ab. Neue, nichtmikroskopische Schnelltests zur Diagnose einer Malaria tropica beruhen auf dem Nachweis von *P. falciparum*-spezifischen Proteinen: Histidin Rich Proteine 2 (HRP2) bzw. parasitenspezifischer Laktatdehydrogenase (pLDH).

Methodik: Zwei bereits kommerziell erhältliche Tests (ICT Malaria P.f.®, ICT, Sydney, Australien und OptiMAL®, Flow Inc, Oregon, USA) wurden im Rahmen einer prospektiven, multizentrischen Studie vergleichend mit mikroskopischer Standarddiagnostik und PCR an Tropenrückkehrern mit Fieber evaluiert.

Ergebnisse: 231 Patienten wurden untersucht, von denen bei 53 (22,9%) mikroskopisch und/oder in der PCR eine Malaria tropica nachgewiesen war. Während der auf dem Nachweis von HRP2 beruhende Test (ICT Malaria P.f.®) eine Sensitivität von 92,5% und eine Spezifität von 98,3% hatte, lag die Sensitivität des auf dem Nachweis von pLDH basierendem Test (OptiMAL®) bei 88,5% (die Spezifität 99,4%).

Schlussfolgerungen: Malaria-Schnelltests sind potentiell zur Beschleunigung und Verbesserung der Diagnose einer Malaria tropica geeignet, insbesondere wenn die Diagnose von Laborpersonal ohne ausreichende Erfahrung in der Beurteilung mikroskopischer Präparate gestellt werden muß. Sie können daher als zusätzliches Instrument in Ergänzung zur mikroskopischen Diagnostik zum Screening von fieberhaften Tropenrückkehrern empfohlen werden. Keinesfalls sollten Schnelltests jedoch die Anfertigung und Beurteilung eines mikroskopischen Präparates ersetzen.

Schlüsselwörter: Malariadiagnose, Schnelltests, Tropenrückkehrer.

Summary

Diagnosis of falciparum malaria by means of immunochromatographic tests

Objective: To evaluate diagnostic tools based on the dipstick principle for the detection of histidine-rich protein 2 (HRP-2) and parasite-specific lactate-dehydrogenase (pLDH) of *Plasmodium falciparum*.

Methods: Specimens from 231 returnees from malaria-endemic areas with fever were screened during a prospective multi-centre study.

Results: Samples from 53 patients (22.9%) were positive for falciparum malaria by microscopy and/or PCR. While the test kit based on the detection of HRP2 performed with a sensitivity of 92.5% and a specificity of 98.3%, the kit for the detection of pLDH showed a sensitivity of 88.5% and a specificity of 99.4%.

Discussion: Dipstick tests have the potential of enhancing speed and accuracy of the diagnosis of falciparum malaria, especially if non-specialised laboratories are involved.

Key words: Malaria diagnosis, dipstick tests, non-immune patients.

Danksagung: Diese Studie wurde durch ein Forschungsstipendium der Deutschen Akademie für Flugmedizin unterstützt.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Literatur

1. BEADLE, C., LONG, G., WEISS, W., MCELROY, P., MARET, S., OLOO, A., HOFFMAN, S. (1994): Diagnosis of malaria by detection of Plasmodium falciparum HRP-2 antigen with a rapid dipstick antigen-capture assay. Lancet 343, 564-568.
2. DI PERRI, G., OLLIARO, P., NARDI, S., ALLEGRANZI, B., DEGANELLO, R., VENTO, S., LANZAFAME, M., CAZZADORI, A., BONORA, S., CONCIA, E.: (1997): The ParaSight-F rapid dipstick antigen capture assay for monitoring parasite clearance after drug treatment of Plasmodium falciparum malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg 91, 403-405.
3. GARCIA, M., KIRIMOAMA, S., MARLBOROUGH, D., LEAFASIA, J., RIECKMANN, K. (1996): Immunochromatographic test for malaria diagnosis. Lancet 347, 1549.
4. HUMAR, A., OHRT, C., HARRINGTON, M., PILLAI, D., KAIN, K.: (1997): Parasight F test compared with the polymerase chain reaction and microscopy for the diagnosis of Plasmodium falciparum malaria in travelers. Am J Trop Med Hyg 56, 44-48.
5. JELINEK, T., PRÖLL, S., HESS, F., VON SONNENBURG, F., KABAGAMBE, K., LÖSCHER, T., KILIAN, A. H. D. (1996): Geographical differences in the sensitivity of polymerase chain reaction for detection of P. falciparum infection in Uganda. Am J Trop Med Hyg 55, 647-651.
6. KILIAN, A., MUGHUSU, E., KABAGAMBE, G., VON SONNENBURG, F. (1997): Comparison of two rapid, HRP2-based diagnostic tests for Plasmodium falciparum. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 91, 666-667.
7. MILNE, L., KYI, M., CHIODINI, P. (1994): Accuracy of routine laboratory diagnosis of malaria in the United Kingdom. J Clin Pathol 47, 740-742.
8. MOLYNEUX, M., FOX, R. (1993): Diagnosis and treatment of malaria in Britain. Br Med J 306, 1175-1180.
9. PALMER, C., LINDO, J., KLASKALA, W., QUESADA, J., KAMINSKY, R., BAUM, M., AGER, A. (1998): Evaluation of the OptiMAL test for rapid diagnosis of Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum malaria. J Clin Microbiol 36, 203-206.
10. SNOUNOU, G. (1996): Detection and identification of the four malaria parasite species infecting humans by PCR amplification. Methods Mol Biol 50, 263-91

Korrespondenzadresse

Dr. Tomas Jelinek
Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der Universität

Leopoldstraße 5
D-80802 München · Deutschland

Telefon: (x49)-89-2180 3517
Telefax: (x49)-89-33 61 12
E-Mail: jelinek@lrz.uni-muenchen.de

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie

Jahr/Year: 1999

Band/Volume: 21

Autor(en)/Author(s): Jelinek Tomas, Grobusch Martin P., Schwenke S., Steidl S., Sonnenburg F. v., Nothdurft Hans-Dieter, Klein E., Löscher Th.

Artikel/Article: Sensitivität und Spezißtät der Malaria-Diagnostik durch Teststreifen. 107-112