diagnostyka laboratoryjna Journal of Laboratory Diagnostics
2011 • Volume 47 • Number 3 • 341-351

Rekomendacje • Recommendations

Standardy w zakresie laboratoryjnych czynności w parazytologii medycznej, oceny ich jakości i wartości diagnostycznej oraz laboratoryjnej interpretacji i autoryzacji wyników badań (propozycje)

Standards in the range of laboratory activities in medical parasitology, estimation of their quality and diagnostics value, as well as interpretation and authorization of the tests results (proposals)

Przemysław Myjak[1], Czesław Głowniak[2], Elżbieta Gołąb[3], Magdalena Jaborowska-Jarmoluk[4], Danuta Kosik-Bogacka[5], Joanna Matowicka-Karna[6], Piotr Nowak[7], Halina Pietkiewicz[1], Beata Szostakowska[1], Natalia Wnukowska[3], Hanna Żarnowska-Prymek[8,9]

[1]Zakład Parazytologii Tropikalnej, Międzywydziałowy Instytut Medycyny Morskiej i Tropikalnej, Gdański Uniwersytet Medyczny,Gdynia, [2]Krajowa Rada Diagnostów Laboratoryjnych, Warszawa, [3]Zakład Parazytologii Lekarskiej, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, Warszawa, [4]Pracownia Parazytologii, Wojewódzka Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna, Szczecin, [5]Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Medycznej, Pomorski Uniwersytet Medyczny, Szczecin, [6]Zakład Laboratoryjnej Diagnostyki Klinicznej, Uniwersytet Medyczny, Białystok, [7]Pracownia Parazytologii, Zakład Mikrobiologii Szpitala Uniwersyteckiego, Kraków, [8]Klinika Chorób Odzwierzęcych i Tropikalnych, WUM, Warszawa [9]Pracownia Parazytologii, Wojewódzki Szpital Zakaźny, Warszawa

Streszczenie

Grupa pierwszych polskich specjalistów z laboratoryjnej parazytologii medycznej przedstawia pod powszechną dyskusję „Kryteria diagnostyczne chorób pasożytniczych". Dla potwierdzenia przypadku zachorowania i wprowadzenia skutecznego leczenia, niezbędne jest przeprowadzenie badań laboratoryjnych, w których wykorzystywane są różne metody, m.in. mikroskopowe, serologiczne, molekularne, hodowla in vitro/in vivo. Proponowane zalecenia zawierają przepisy ogólne, zasady pobierania, konserwowania i przechowywania różnego materiału biologicznego oraz metody diagnostyczne. Dużą uwagę zwrócono na czas przeglądania preparatów mikroskopowych niezbędny dla prawidłowej oceny badanego materiału oraz na ocenę badań ilościowych pasożytów we krwi lub kale. Przedstawiono także sugestie dotyczące informacji, jakie powinien zawierać wynik badania laboratoryjnego. W badaniach immunologicznych zwrócono uwagę na wykrywanie swoistych przeciwciał lub antygenów pasożyta w kale i krwi oraz na zapotrzebowanie diagnostyczne tych badań w Polsce. Zaproponowano, aby badania molekularne stosowano w diagnostyce chorób inwazyjnych w przypadkach, gdy pasożyty znajdują się poniżej progu ich wykrywalności metodami mikroskopowymi lub gdy nie można dokonać jednoznacznej identyfikacji pasożytów ze względu na ich zbyt duże podobieństwo morfologiczne. Na zakończenie przedstawiono definicje diagnostyczne (kryteria rozpoznawania) wybranych chorób pasożytniczych, które określano jako przypadek: potwierdzony, prawdopodobny lub możliwy.

Summary

The group of the first Polish specialists in the field of laboratory medical parasitology presents recommendations „Diagnostic criteria of parasitic diseases" under general discussion. For confirmation of the disease and introduction of effective treatment, it is necessary to perform laboratory tests based on different diagnostic tools, e.g. microscopic, serologic and molecular methods or in vitro / in vivo culture. Proposed recommendations include general regulations, rules for the collection, preservation and storage of various biological specimens, and tools available for diagnosis. A special attention was paid to the time of viewing microscopic slides needed for proper estimation of the examined material, and to estimation of quantitative examination of parasites in blood or faeces. Moreover, suggestions on information which should contain the result of the laboratory examination were provided. In the case of immunological examinations, the attention was paid to detection of specific antibodies or

antigens of the parasite in faeces and/or blood, as well as to the diagnostic necessity of this kind of investigation in Poland. One proposed to use molecular methods in diagnostics of parasitic diseases in cases when parasites are under detection limit of microscopic methods or if unequivocal identification of the parasite is not possible due to their too large morphological resemblance. In conclusion, diagnostic case definitions, defined as confirmed, probable or possible (diagnostic criteria) for chosen parasitic diseases were proposed.

Słowa kluczowe: pasożyty, choroby inwazyjne, metody diagnostyczne, koprologia, immunologia, badania molekularne

Key words: parasites, parasitic diseases, diagnostics tools, coprology, immunology, molecular investigation

Uwagi ogólne

1. Laboratorium opracowuje, stosownie do wymagań określonych w rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 21 stycznia 2009 r. zmieniającego rozporządzenie w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych, formularz zlecenia na badania laboratoryjne. Formularz powinien zawierać pola na informacje dotyczące zleceniodawcy, osoby badanej, kierunku badań, próby badanej a także klinicznych wskazań do wykonania badania.

2. Laboratorium opracowuje i udostępnia zleceniodawcom instrukcje pobierania materiału do badań laboratoryjnych. Instrukcje przeznaczone do każdego rodzaju wykonywanego badania powinny uwzględniać wymagania odnośnie sposobu przygotowania pacjenta, pobierania materiału, w tym jego ilości, daty i godziny pobrania, warunków przechowywania oraz transportu materiału do laboratorium. Materiał do badań może być transportowany i dostarczany do laboratorium wyłącznie przez upoważnione osoby lub firmy posiadające uprawnienia do transportu materiału zakaźnego zgodnie z obowiązującymi przepisami. Transport ludzkiego materiału biologicznego potencjalnie zakaźnego musi odbywać się zgodnie z normą UN3373.

3. Laboratorium stosuje metody badawcze, które odpowiadają aktualnej wiedzy medycznej i są opublikowane w piśmiennictwie naukowym oraz są rekomendowane przez ośrodki referencyjne lub konsultanta krajowego.

4. Laboratorium opracowuje procedury badawcze i instrukcje wykonywania poszczególnych metod badawczych oraz formularze sprawozdań z realizacji badań. Procedury badawcza powinna zawierać precyzyjne informacje odnośnie wymaganego sprzętu, odczynników oraz warunków środowiska zewnętrznego dla wykonywania poszczególnych rodzajów badań.

5. Celem uniknięcia kontaminacji w przypadku badania każdego materiału biologicznego zaleca się używanie jednorazowego drobnego sprzętu laboratoryjnego (bagietki, pipetki, ezy, probówki, szkiełka podstawowe i nakrywkowe, opakowania, itp.).

6. Jakość wykonywanych przez laboratorium badań oraz przestrzeganie warunków pracy zawartych w przepisach BHP zapewniają przeprowadzane okresowo kontrole wewnętrzne i zewnętrzne. W przypadku stwierdzenia nieprawidłowości, laboratorium wprowadza działania korygujące i zapobiegawcze w swoim zakresie kompetencji.

7. Dokumentacja prowadzona przez laboratorium w zakresie ujętym w przepisach dotyczących dokumentacji medycznej jest przechowywana przez czas określony przez te przepisy.

Rekomendacje

A. BADANIA MIKROSKOPOWE i MAKROSKOPOWE

1. Kał – najczęściej badany materiał w Polsce

1.1. Pobieranie materiału

- Pojemnik należy opisać nazwiskiem i imieniem pacjenta, datą i godziną pobrania względnie nakleić etykietę z kodem paskowym zawierającym powyższe dane.
- Kał należy pobrać przed rozpoczęciem leczenia. W przypadku wcześniejszego stosowania leków (m.in. antybiotyki) lub stosowania w badaniach radiologicznych środków kontrastowych, jak również leków przeciwpasożytniczych (badanie kontrolne po leczeniu), kał należy pobrać po upływie 1-3 tygodni od zakończenia stosowania tych środków.
- Kał powinien być oddany do czystych i suchych, papierowych naczyń woskowanych lub wykonanych z tworzywa sztucznego względnie na czysty papier i następnie przeniesiony do pojemników z łopatką. Kał nie może być zanieczyszczony moczem, wodą lub glebą. Zaleca się pobranie próbek kału z trzech różnych miejsc. Ze względu na możliwość fermentacji, standardowy pojemnik na kał, powinien być wypełniony najwyżej do 2/3 jego pojemności.
- Dla celów diagnostycznych zaleca się trzykrotne pobranie i badanie kału, natomiast w odniesieniu do pacjentów powracających z „tropików" czterokrotne, ostatnie badanie po prowokacji środkami czyszczącymi. Kał do badań pobierany jest w okresie 10 dni w odstępach 2-3 dniowych, co podnosi prawdopodobieństwo wykrycia pasożytów, zwłaszcza cyst pierwotniaków, które wydalane są nieregularnie. Przy znacznym podejrzeniu giardiozy lub amebozy, badania koproskopowe wykonywane są nawet sześciokrotnie w okresie 14 dni.

1.2. Transport materiału

- Postacie dojrzałe lub fragmenty helmintów (robaków) (np. człony tasiemca) należy umieścić w pojemniku z niewielką ilością wody i przechowywać w temperaturze pokojowej. Materiał należy dostarczyć do laboratorium w ciągu 24 godzin.
- Pobrane próbki kału należy dostarczyć do laboratorium możliwie jak najszybciej od momentu pobrania, wyma-

gany czas podano poniżej. Pojemniki z kałem należy transportować w temperaturze pokojowej (do oznaczenia koproantygenów transportować schłodzone), w pozycji pionowej, zabezpieczając je przed zgnieceniem lub pęknięciem.

- Kał wodnisty lub uzyskany po środkach przeczyszczających należy badać do 30 min., a kał luźny do 60 min. po jego oddaniu (istotne ze względu na trofozoity pierwotniaków ulegające dezintegracji).
- Kał uformowany na obecność cyst/oocyt pierwotniaków bądź jaj helmintów (robaków) można badać do 72 godz. od momentu pobrania. Do czasu badania, próbki powinny być przetrzymywane i transportowane w temp. od +4°C do +10°.C. Jeżeli jest to niemożliwe, kał należy jak najszybciej utrwalić w odpowiednim utrwalaczu właściwym dla procedury badania (np. SAF, PVA).

1.3. Procedury badania kału

1.3.1. Badanie makroskopowe

W badaniu makroskopowym określamy konsystencję kału (wodnisty, luźny, uformowany), obecność śluzu, krwi, postaci dorosłych lub fragmentów pasożytów.

1.3.2. Badanie mikroskopowe

Badanie każdej próbki kału powinno obejmować, co najmniej:

- preparat w soli fizjologicznej - nie ma potrzeby wykonywania tego badania w przypadku, gdy kał pochodzi z dnia poprzedniego,
- preparat podbarwiany płynem Lugola lub innym podbarwiaczem,
- preparaty po zagęszczeniu metodą sedymentacji i równolegle metodą flotacji - wybór w zależności od możliwości laboratorium (optymalnie metoda sedymentacyjna formalinowo- octanowo-etylowa i flotacyjna Fausta),
- preparat gruby wg Kato i Miura - zalecany gdy laboratorium nie może wykonać metod zagęszczających).
- preparat trwale barwiony (np. hematoksylina, trichrom, Ziehl-Neelsen) - w przypadku potwierdzenia wykrytych obiektów, kału biegunkowego lub wskazań klinicznych,
- preparat trwale barwiony Chromotropem 2R na mikrosporydia jelitowe - w przypadku wskazań/przesłanek klinicznych, pacjentów immunoniekompetentnych z biegunką lub zalecenie lekarza,
- założenie hodowli *in vitro* w kierunku nicieni jelitowych (*Strongyloides, Trichostrongylus, Ancylostoma/Necator*), bądź pierwotniaków jelitowych (*E. histolytica sensu lato*., *Balantidium coli*) - w przypadku powrotu pacjenta ze strefy tropikalnej lub subtropikalnej, a w przypadku podejrzenia strongyloidozy także osób pochodzących z regionu południowo-wschodniego Polski, test wykluwania miracydiów (hatching test) na obecność żywych jaj *Schistosoma* spp. w przypadku osób powracających z terenów endemicznych schistosomozy.

1.3.3. Ocena preparatów

- **Rozmaz kału** - ok. 2 mg kału (rozmaz w soli fizjologicznej, rozmaz podbarwiany) lub preparat po zagęszczeniu przykryć szkiełkiem nakrywkowym, najlepiej o wymiarach 22 x 22 mm. Należy przejrzeć cały preparat, pole po polu widzenia, pod powiększeniem obiektywu 16-20 x, podejrzane obiekty przeglądać pod powiększeniem obiektywu 40 lub 60x; zaleca się, aby 1/3 preparatu przejrzeć wyłącznie przy użyciu obiektywu 40x. Przewidywany czas badania – ok. 5 min.
- **Preparat gruby** wg Kato i Miura przykryty skrawkiem celofanu o wymiarach ok. 22 x 40-50 mm, należy przejrzeć cały preparat pod powiększeniem obiektywu 10-20x w poszukiwaniu oocyst *Sarcocystis* i *Isospora*. Przewidywany czas badania – ok. 5 min.
- **Preparat trwale barwiony** (hematoksylina, trichrom, Ziehl-Neelsen, Kinyoun, Chromotrop 2R) - zaleca się przejrzeć 200-300 pól widzenia pod immersyjnym (100x) powiększeniem obiektywu (lub więcej pól, gdy wykryto podejrzane obiekty). Przewidywany czas badania - ok. 15 min.

1.4. Wynik badania mikroskopowego kału powinien zawierać następujące informacje:

- nazwę gatunkową pasożyta i jego postać rozwojową,
- w przypadku stwierdzenia jaj *Schistosoma* należy podać ich żywotność (żywe czy martwe),
- w przypadku stwierdzenia jaj *Ascaris lumbricoides* należy podać czy są zapłodnione czy nie,
- orientacyjnie liczbę form diagnostycznych pasożytów, np. jaj, lub cyst
- inne wykryte struktury świadczące o patologii: makrofagi, krwinki czerwone, leukocyty wieloróżnojądrzaste (PMNs), kryształy Charcot-Leyden'a, ziarna skrobi, włókna mięsne, kule tłuszczu.

Wskazane jest podanie przybliżonej liczby postaci rozwojowych pasożytów wymienionych obiektów, jak niżej:

- mało: poniżej 2 w 10 polach widzenia (obiektyw 40 lub 100 x)
- średnio: 3-9 w 10 polach widzenia
- dużo: powyżej 10 w 10 polach widzenia

Na specjalne życzenie zlecającego badanie należy udokumentować w wyniku badania obecność innych form przypominających postacie rozwojowe pasożytów (artefakty, elementy roślinne, takie jak: pyłki, włoski lub włókna).

1.5. Badanie mikroskopowe wymazu okołoodbytniczego w kierunku *Enterobius vermicularis*

Materiał należy pobrać przed rozpoczęciem leczenia i ponownie 2-3 tygodnie po jego zakończeniu dla celów kontrolnych. Wymaz należy pobrać rano, przed myciem i oddaniem kału, z okolic odbytu po rozchyleniu fałdów skórnych. Wymaz powinien być pobrany trzykrotnie w odstępach 3-5 dni.

Materiał uzyskujemy:

- przy użyciu zestawu dostępnego w handlu wg metody Halla (NIH) - pobranie materiału na bagietkę z tomofanem (celofanem)
- wg metody Grahama przy użyciu przylepca celofanowego (taśmy klejącej).
- Pobrany wymaz należy zabezpieczyć i jak najszybciej

przetransportować do laboratorium w temperaturze pokojowej. Należy obejrzeć cały preparat bezpośrednio pod mikroskopem (optymalny obiektyw 20x) w poszukiwaniu jaj i ewentualnie postaci dorosłych. Przewidywany czas badania - ok. 3 min. W wymazie okołoodbytniczym można też znaleźć jaja *Taenia* spp.

2. KREW – badania wykonywane najczęściej u osób powracających z terenów endemicznego występowania pasożytów, z krajów tropikalnych lub subtropikalnych.

2.1. Pobieranie i transport materiału

- Krew do badań należy pobrać przed rozpoczęciem leczenia:
  - w przypadku podejrzenia malarii lub babeszjozy bezzwłocznie, także przy stosowaniu środków farmakologicznych,
  - w przypadku podejrzenia leiszmaniozy czy filariozy, nie jest konieczne natychmiastowe pobranie materiału,

Liczba pobrań materiału, jak i wykonanych badań zależy od rodzaju podejrzewanej inwazji pasożytniczej.

- Wykonanie i ocena rozmazów krwi obwodowej:
  - z krwi włośniczkowej wykonać od razu po 2-3 rozmazy każdego rodzaju (cienki rozmaz i grubą kroplę),
  - jeżeli rozmazy nie są wykonywane bezpośrednio po pobraniu krwi, należy pobrać krew włośniczkową lub krew żylną do probówki z EDTA,
  - rozmazy powinny być wykonane do 30 min. od pobrania krwi,
  - wykonane rozmazy krwi należy zabezpieczyć przed owadami (muchami). Po całkowitym wyschnięciu rozmazów należy umieścić je w pudełku lub zawinąć w papier, przechowywać w temp. pokojowej.
- Metoda zagęszczania mikrofilarii:
  - 1 ml krwi żylnej pobranej na EDTA należy zmieszać z 9 ml 1-2 % roztworu formaliny w wodzie destylowanej lub w buforze PBS (zapobieganie kontaminacji), względnie należy zmieszać z wodą destylowaną. Zawiesinę po całkowitej hemolizie należy odwirować (500x *g* przez 10 min.) i z osadu wykonać preparaty, tzw. grubej kropli, po wysuszeniu należy preparat utrwalić metanolem i zabarwić – metoda wg Knott'a.
  - przy zastosowaniu filtrów membranowych krew należy pobrać jak wyżej. Zhemolizowaną krew należy przesączyć przez filtry membranowe, o średnicy porów 5 µm w przypadku podejrzenia występowania we krwi mikrofilarii osłonkowych, a 3 µm mikrofilarii bezosłonkowych. Najlepiej zastosować Filtry Nucleopore 25 mm średnicy. Cały filtr, na którym znajdują się wszystkie przefiltrowane mikrofilarie należy barwić barwnikiem Giemzy.

W przypadku nie wykrycia zarodźców malarii w pierwszym badaniu, badania należy wykonywać co 6-8 godz. przez kolejne 3 dni. W przypadku wiciowców tkankowych, badanie należy wykonać raz dziennie przez 3 kolejne dni.

Przy pobieraniu krwi w kierunku filariozy należy pamiętać o cykliczności występowania mikrofilarii we krwi (dzienna w przypadku zarażenia *Loa loa* i nocna w przypadku *Wuchereria bancrofti*), wobec tego należy uwzględnić różnicę czasu między miejscem zarażenia a Polską. Jeżeli nie mamy podejrzenia, co do gatunku filarii, krew należy pobierać, co 8-12 godz. przez 3 kolejne dni.

Uwaga: o życiu chorego na malarię mogą decydować nawet godziny. Wobec powyższego, przy braku całodobowego dostępu do badań diagnostycznych szpital powinien zabezpieczyć możliwości wykonywania szybkich testów immunochromatograficznych wykrywających antygeny zarodźców, przy jednoczesnym przygotowaniu rozmazów krwi, które mogą być później zbadane mikroskopowo.

2.2. Procedury mikroskopowego badania krwi

2.2.1. Badanie próbki krwi powinno obejmować:

co najmniej (w zależności od zlecenia):

- preparat (rozmaz bezpośredni) w soli fizjologicznej – tylko w celu obserwacji ruchu świdrowców i mikrofilarii,
- cienki rozmaz krwi – w kierunku wszystkich gatunków pasożytów krwi,
- preparat tzw. grubą kroplę – w kierunku wszystkich pasożytów krwi, szczególnie wywołujących malarię i filariozy,
- ocena parazytemii,

a ponadto

- koncentrację wg Knott'a – gruba kropla w kierunku mikrofilarii,
- lub filtrowanie przez filtr membranowy – w kierunku mikrofilarii, łącznie z obliczeniem parazytemii.

Rozmazy krwi należy zabarwić:

- jednym z barwników z grupy Romanowskiego, np. barwnikiem Giemzy, Leishmanna lub Wrighta, natomiast filtry wyłącznie barwnikiem Giemzy. Cienkie rozmazy krwi można barwić metodą MGG (May-Grünwald-Giemza) – w celu wykrycia i identyfikacji wszystkich pasożytów krwi
- hematoksyliną z eozyną – w kierunku wykrycia i różnicowania mikrofilarii. W barwieniu mikrofilarii metodą Giemzy źle wybarwia się osłonka, a dobrze jądra mikrofilarii, natomiast w przypadku barwienia hematoksyliną dobrze wybarwia się zarówno osłonka, jak i jądra.

2.2.2. Ocena preparatu

- W przypadku cienkiego rozmazu wykonywanego w diagnostyce malarii (babeszjozy, trypanosomozy) oglądamy 200-300 pól widzenia (pw) pod powiększeniem obiektywu 100x, Badając rozmaz gruby – przeglądamy 100 pw (WHO) lub więcej (CLSI). Przewidywany czas badania - ok. 15 min. na 1 preparat.
- W badaniach w kierunku filarioz (mikrofilarii) przeglądamy cały preparat świeży (mokry), pole po polu widzenia, pod powiększeniem obiektywu 10-20x i 40x dla obserwacji szczegółów wykrytych larw lub artefaktów. Cały preparat barwiony przeglądamy dokładnie pod powiększeniem obiektywu 10-20x i 100x dla uwidocznienia szczegółów wykrytych mikrofilarii.

2.2.3. Wynik badania mikroskopowego powinien zawierać:

- nazwę gatunkową wykrytego pasożyta (w trudnych przypadkach przy małej parazytemii – nazwę rodzajową),
- postać rozwojową pasożyta,
- parazytemię – procent zarażonych krwinek lub liczbę pasożytów w 1 µl krwi, ewentualnie liczbę pasożytów na 200 leukocytów (*Plasmodium*), liczbę mikrofilarii w 1 ml krwi,
- wykryte artefakty (np. grzyby przypominające wyglądem mikrofilarie – zanieczyszczenie z powietrza).

Poza badaniem mikroskopowym stosuje się:

2.3. Zakładanie hodowli *in vitro* w kierunku *Leishmania* i *Trypanosoma cruzi*

2.4. Badanie w kierunku antygenów *Plasmodium spp.* oraz filarii (*Wuchereria bancrofti*, *Loa loa*)

2.5. Badanie w celu wykrycia swoistych przeciwciał – zazwyczaj w laboratorium referencyjnym

2.6. Badanie na obecność kwasów nukleinowych wszystkich gatunków pasożytów krwi.

ad 2.3.-2.6. – patrz niżej

3. BADANIE MATERIAŁU Z UKŁADU MOCZOWO-PŁCIOWEGO

Mocz jest materiałem używanym najczęściej do wykrycia jaj *Schistosoma haematobium i* trofozoitów *Trichomonas vaginalis*, rzadziej jaj *Dioctophyma renale* czy mikrofilarii.

3.1. Badanie moczu w kierunku *Schistosoma haematobium.*

Najlepiej badać mocz kolekcjonowany między godziną 12.00 a 15.00, ewentualnie po wysiłku. Pobieramy 100 - 200 ml moczu, ważny jest jego końcowy strumień, można też użyć całodobową zbiórkę moczu (po sedymentacji pozostawić 100-200 ml moczu). Powinien być on przetrzymywany i transportowany w warunkach schłodzenia, co zapobiega wylęgowi miracydiów. Poleca się: odwirowanie moczu (400 x *g* przez 5 min.) i wykonanie preparatu bezpośredniego lub filtrowanie przez filtry membranowe (średnica porów 8 µm) lub bibułę filtracyjną. Sposób i czas oceny preparatów jak w badaniu kału. Rekomendowane trzykrotne pobranie materiału. W wyniku należy koniecznie zaznaczyć czy jaja są żywe czy martwe.

3.2. Badanie moczu lub wydzieliny dróg moczowo-płciowych w kierunku *Trichomonas vaginalis*

Należy pobrać początkowy strumień moczu, odwirować 400 x *g* przez 5 minut i wykonać preparat bezpośredni oraz trwale barwiony. Z wymazu z pochwy lub szyjki macicy należy wykonać preparat w soli fizjologicznej i barwiony. Najlepiej barwić barwnikiem Giemzy, ewentualnie trichromem lub hematoksyliną. Pomocne może być też barwienie błękitem metylenowym lub zielenią malachitową. Wskazane jest założenie hodowli *in vitro* (podłoże Roiron, Diamonda, Simitch'a). Rekomendowane trzykrotne pobranie materiału.

4. MIKROSKOPOWE BADANIE MATERIAŁU Z DRÓG ODDECHOWYCH

Stosuje się do wykrycia jaj *Paragonimus* spp., rzadziej larw *Strongyloides*, *Ancylostoma*/*Necator, Ascaris lumbricoides* oraz *Entamoeba histolytica,* czy *Cryptosporidium* spp. Materiał: popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe (BAL) lub plwocinę pobraną rano należy dostarczyć jak najszybciej (do 60 min.) do laboratorium, (temperatura pokojowa). Po odwirowaniu materiału należy wykonać preparat bezpośredni (jak w przypadku badania kału). Jeżeli plwocina jest kleista należy dodać równą objętość 3% roztworu NaOH, odwirować 500 x *g* przez 5 min. i wykonać preparat z osadu (świeży/mokry). W razie potrzeby można materiał utrwalić i postępować podobnie jak przy badaniu kału. Rekomendowane jest trzykrotne pobranie i badanie materiału.

5. BADANIE ASPIRATÓW

5.1. Płyn mózgowo-rdzeniowy

Materiał ten stosuje się do wykrywania zarażenia pasożytami ośrodkowego układu nerwowego, w tym: *Trypanosoma b. gambiense*, *Trypanosoma b. rhodesiense*, pełzaków amfizoicznych (*Acanthamoeba* spp.*, Naegleria fowleri* i *Balamuthia mandrillaris*), *Toxoplasma gondii*.

Materiał w objętości 5-10 cm^3 należy pobrać do jałowego pojemnika i dostarczyć jak najszybciej (do 60 min) do laboratorium w temp. 37°C.

5.2. Treść dwunastnicza

Materiał ten stosuje się do wykrywania *Giardia intestinalis*, *Strongyloides stercoralis*, *Fasciola hepatica, Cryptosporidium* spp.*,* rzadziej innych pasożytów.

Materiał uzyskuje się:

- sondą dodwunastniczą - uzyskaną żółć należy odwirować 500 x *g* przez 2-3 min. i wykonać od razu preparat bezpośredni (mokry). Powinno się również ocenić ogólny obraz mikroskopowy żółci. Jeżeli nie można wykonać badania w okresie 1-2 godz., materiał należy utrwalić i postępować jak z kałem. Wskazane jest wykonanie barwienia rozmazów np. Giemzą (*Giardia*) lub Ziehl-Neelsen'em (*Cryptosporidium* spp.)
- przy pomocy testu sznurkowego (string test/Enterotest) – z uzyskanego materiału wykonujemy od razu preparat bezpośredni i/lub preparat barwiony.

Materiał pobiera się zazwyczaj jednokrotnie, najlepiej po zakończeniu cyklu badań kału. Do laboratorium powinien być dostarczony w temperaturze pokojowej.

5.3. Aspiraty z torbieli wątroby

Materiał ten stosuje się do badań na obecność skoleksów lub materiału genetycznego *Echinococcus multilocularis* i *Echinococcus granulosus*.

Materiał uzyskiwany jest śródoperacyjnie, chirurdzy nie polecają obecnie wykonywania biopsji cienkoigłowej ze względu na możliwość rozsiania inwazji (występowania protoskoleksów w torbieli). Badanie parazytologiczne należy wykonać w ciągu 6 godzin od pobrania materiału; transport i przechowywanie prób do czasu badania: w temp. schłodzonej do +4 do +10°C. Płyn z torbieli należy odwirować przy 500 x *g* przez 10 min. i wykonać oraz przejrzeć, co najmniej trzy preparaty bezpośrednie. Materiał przeznaczony do ba-

dań molekularnych może być transportowany w stanie schłodzonym, zamrożonym (jak najszybciej) lub po utrwaleniu w 70-96% alkoholu etylowym (do 7 dni). Zazwyczaj materiał pobiera się jednorazowo.

5.4. Materiał pobrany podczas rektoskopii lub z ropni wątroby/płuc

Materiał ten może być badany na obecność *Entamoeba histolytica* czy *Balantidium coli*.

Materiał pobierany ze zmian na powierzchni śluzówki lub z ropni powinien być zmieszany z solą fizjologiczną i badany bezpośrednio pod mikroskopem. Należy wykonać preparat trwale barwiony (trichrom, hematoksylina) ewentualnie utrwalić w PVA, a następnie powinien być barwiony. Materiał ten można przeznaczyć także do badań molekularnych (przesyłamy schłodzony, zamrożony lub utrwalony w etanolu, tak jak w przypadku kału). Zazwyczaj materiał pobiera się jednorazowo.

5.5. Materiał z gruczołów limfatycznych, szpiku, śledziony

Materiał ten badamy w kierunku ruchliwych postaci (trypomastigota) *Trypanosoma b. gambiense* lub *Trypanosoma b. rhodesiense*. W celu wykrycia zarażenia *Leishmania donovani*, materiał uzyskuje się poprzez aspiracje igłą (biopsje cienkoigłowe) ze szpiku, śledziony gdzie wykrywa się nieruchliwe postacie amastigota. W każdym przypadku należy wykonać rozmazy, utrwalić w metanolu i wybarwić Giemzą. W razie potrzeby materiał zabezpieczyć do dalszych badań (np. hodowli *in vitro,* badań molekularnych). Zazwyczaj materiał pobiera się jednorazowo.

5.6. Materiał aspirowany ze zmian skórnych lub preparat odciskowy

Pozwala na wykrycie postaci amastigota w przypadku leiszmanioz skórnych lub skórno-śluzówkowych. Należy wykonać rozmazy, utrwalić metanolem i barwić Giemzą. Wskazane założenie hodowli *in vitro* (podłoże NNN) i zabezpieczenie materiału do badań molekularnych. Zazwyczaj materiał pobiera się jednorazowo.

Przeglądanie mikroskopowe preparatów z powyższych materiałów analogicznie jak w przypadku badaniu kału lub krwi

6. MATERIAŁ TKANKOWY

6.1. Materiał tkankowy do badań histopatologicznych

Fragmenty tkanek łącznie z materiałem biopsyjnym i sekcyjnym powinny być badane zarówno przez histopatologów, jak i parazytologów.

Materiał do badań stanowią:

- barwione i/lub niebarwione preparaty mikroskopowe,
- bloczki parafinowe,
- materiał utrwalony w formalinie,
- materiał utrwalony w alkoholu przeznaczony do badań molekularnych.

W większości przypadków wystarczające jest barwienie preparatów hematoksyliną z eozyną, w przypadku podejrzenia zarażenia *E. multilocularis* wykonywane jest barwienie PAS.

6.2. Materiał tkankowy do badań w kierunku włośnicy

Do badań parazytologicznych, pobrany wycinek mięśnia naramiennego (ok. 0,5g) należy przesłać do laboratorium w 0,9% NaCl.

Celem wykrycia larw włośni stosujemy

- metodę kompresorową,
- trawienie sztucznym sokiem żołądkowym.

Uzyskane larwy analizujemy pod względem parazytologicznym i molekularnym.

6.3. Materiał tkankowy stosowany do badań w kierunku pełzaków amfizoicznych (pierwotnie wolnożyjących)

Materiałem do badań mogą być:

- preparaty mikroskopowe, barwione hematoksyliną i eozyną,
- preparaty mikroskopowe, niebarwione (badania immunologiczne),
- nieutrwalone fragmenty mózgu lub płyn mózgowordzeniowy (PCR, FISH),
- nieutrwalone zeskrobiny z rogówki (PCR, FISH),
- tkanki utrwalone w etanolu 70-90% (PCR, FISH), lub w mniejszym stopniu bloczki parafinowe,
- posiewy na agarze nieodżywczym

Uwaga! Pracownik laboratorium nie powinien oglądać preparatów dłużej aniżeli przez 5 godzin dziennie, ze względu na zmęczenie wzroku.

7. MATERIAŁ DO BADAŃ W KIERUNKU STAŁYCH EKTOPASOŻYTÓW

Materiał należy pobrać, zazwyczaj jeden raz, przed rozpoczęciem leczenia, a następnie 2-3 tygodnie po jego zakończeniu celem oceny skuteczności leczenia. Materiał pobierają wyłącznie upoważnione osoby (np. dermatolog) w pomieszczeniu do tego przeznaczonym, nigdy w pomieszczeniu laboratoryjnym. W przypadku podejrzenia zarażenia świerzbowcem lub nużeńcem, pobieramy próby ze zmian skórnych: zeskrobiny lub treść gruczołów łojowych i torebek włosowych. W przypadku podejrzenia wszawicy pobiera się materiał z powierzchni skóry, nasady włosów i odzieży (fałdy, szwy).

W pobranym materiale ektopasożyty (formy dorosłe, nimfy lub jaja) poszukuje się makroskopowo, pod małym (5-10 x) powiększeniem lupy, rzadziej 100 x.

B. PARAZYTOLOGICZNA DIAGNOSTYKA IMMUNOLOGICZNA

1.1. Wykrywanie w surowicy swoistych przeciwciał różnych klas (w tym: IgG, IgM, IgA, IgE) produkowanych przez żywiciela po kontakcie z pasożytem.

Badania te należy wykonać w każdym przypadku podejrzenia o parazytozę, zwłaszcza pozajelitową, gdy pobranie materiału do badań bezpośrednich jest zabiegiem inwazyjnym, jako uzupełnienie diagnostyki przy ujemnym wyniku badań mikroskopowych a także w razie niemożności wykonania badania mikroskopowego lub celem retrospektywnego potwierdzenia przebycia parazytozy podczas pobytu w krajach tropikalnych lub subtropikalnych. W każdym przypadku na-

leży podać interpretację uzyskanych wyników.
Do tego celu stosuje się testy odpowiednie dla danej parazytozy. Należy postępować ściśle wg instrukcji producenta (zestawy fabryczne) lub wg instrukcji opracowanej w danym laboratorium.
Do badań serologicznych, zależnie od potrzeby, pobiera się od 3 do 4 ml krwi na skrzep. Surowicę schłodzoną należy dostarczyć do 24 godzin od jej pobrania. (UN 3733 – zamrożona surowica tylko w suchym lodzie).
W Polsce, wykrywanie swoistych przeciwciał ma uzasadnienie:
a) w przypadku podejrzenia rodzimych parazytoz:
- toksoplazmozy - jako badania podstawowe (IgM, IgG, IgA, awidność IgG),
- toksokarozy – jako badania podstawowe (IgG),
- bąblowicy – jako uzupełnienie badań obrazowych, do wykrywania i różnicowania gatunków bąblowca,
- wągrzycy – jako uzupełnienie badań obrazowych (IgG),
- włośnicy – najwcześniej po 3 tygodniach od wystąpienia objawów alergicznych przy ujemnym wyniku badań mikroskopowych wycinka mięśnia lub przy braku zgody pacjenta na biopsję,
- fascjolozy – jako rozszerzenie diagnostyki przy ujemnym wyniku mikroskopowego badania
- kału, szczególnie w pierwszych trzech miesiącach od wystąpienia objawów klinicznych, ponieważ pasożyty mogą być jeszcze niedojrzałe.

b) w przypadku podejrzenia chorób tropikalnych (badania osób powracających lub przyjeżdżających z regionów tropikalnych lub subtropikalnych.
- malarii - najczęściej dla retrospektywnego potwierdzenia przebycia parazytozy,
- amebozy inwazyjnej (tkankowej), jako potwierdzenie inwazji pełzaków do tkanek,
- leiszmaniozy trzewnej, celem potwierdzenia zarażenia przy braku badań mikroskopowych bądź molekularnych,
- filarioz - jako rozszerzenie diagnostyki przy ujemnym wyniku badań mikroskopowych,
- schistosomozy - jako rozszerzenie diagnostyki przy ujemnym wyniku badań mikroskopowych kału lub moczu,
- paragonimozy - jako rozszerzenie diagnostyki przy ujemnym wyniku badań mikroskopowych.

1.2. Wykrywanie swoistych przeciwciał w płynach ustrojowych:
Badanie wykonujemy przy podejrzeniu:
- parazytozy ośrodkowego układu nerwowego (np. wągrzyca, rzadziej toksoplazmoza) - badanie płynu mózgowordzeniowego,
- postaci ocznej toksoplazmozy i toksokarozy – badanie płynu z przedniej komory oka.

2. Badanie na obecność antygenów pasożytów
Materiałem jest najczęściej kał (porcja wielkości orzecha laskowego) lub krew pobrana na EDTA (0,5 - 1 ml).
Badania wykonywane są za pomocą testów komercyjnych zgodnie z zaleceniami producenta. Jeżeli nie ma możliwości wykonania tego badania na miejscu, należy przesłać materiał bezpośrednio po pobraniu, do 24 godzin w stanie schłodzonym. Kał może być również utrwalony (niektórzy producenci zestawów diagnostycznych nie polecają utrwalania) w 10 % formalinie w PBS i przesłany w okresie do 7 dni. Przed badaniem nie powinno się stosować procedur zagęszczania.
2.1. Wykrywanie antygenów we krwi (np. OptiMAL rapid malaria test, BinaxNOW® Malaria test).
2.2. Wykrywanie antygenów w kale (koproantygeny) *Giardia/ Cryptosporidium, Entamoeba histolytica sensu stricto* /*E. histolytica sensu lato.*
2.3. Wykrywanie cyst/oocyst *Giardia* i *Cryptosporidium* metodą immunofluorescencji bezpośredniej (MeriFluor).

C. DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA
Wskazaniami do wykonania badań molekularnych są:
1. niska intensywność zarażenia, poniżej progu wykrywalności metodami mikroskopowymi,
2. trudności w różnicowaniu gatunków podobnych lub bliźniaczych,
3. potrzeba wykonania badań potwierdzających,
4. potrzeba określenia lekooporności pasożyta.

W badaniach molekularnych wykorzystuje się m.in.:
- PCR (reakcja łańcuchowa polimerazy), nested PCR,
- Real-time PCR (PCR w czasie rzeczywistym),
- LAMP (izotermiczna amplifikacja z zastosowaniem pętli),
- FISH.

Materiał do badań molekularnych może być nieutrwalony (badany zaraz po pobraniu), zamrożony lub utrwalony w alkoholu etylowym 70% - 96% - przesłany jak najszybciej. Nie należy używać formaliny, jako utrwalacza. Teoretycznie badanie może być przeprowadzone na każdym materiale biologicznym i w kierunku większości parazytoz. W praktyce badany jest płyn owodniowy w przypadku podejrzenia toksoplazmozy wrodzonej; krew (ok. 2 ml) lub szpik (pobrane na EDTA) przy trudnościach diagnostycznych w malarii, babeszjozie lub leiszmaniozie trzewnej; kał w celu różnicowania *Entamoeba histolytica, E. dispar* i *E. moshkovskii,* wykrywania i różnicowania gatunków *Cryptosporidium oraz* tkanka przy diagnozowaniu bąblowicy wielojamowej (alweokokozy), różnicowania gatunków (genotypów) *Trichinella.*

D. HODOWLA PASOŻYTÓW *IN VITRO* I *IN VIVO*
Hodowle *in vitro* zakłada się w celu zwiększenia wykrywalności niektórych gatunków pierwotniaków oraz helmintów (robaków) lub różnicowania larw filariopodobnych *Ancylostoma* od *Necator.*
W diagnostyce parazytologicznej stosowane są podłoża dla *T. vaginalis* (Roiron, Diamonda, Simitcha), *Entamoeba* spp., *Balantidium coli* (Robinsona, PAHM, stałe MA), *Acanthamoeba* spp. i *Naegleria* spp. (agar nieodżywczy), *Leishmania* spp., *T. cruzi* (podłoże NNN, Philipsa) lub inne dostępne w handlu, *T. gondii* (hodowle tkankowe).
W przypadku *Ancylostoma*/*Necator*/*Trichostrongylus*/*Stron-*

gyloides zakładamy hodowlę wg Harada Mori w probówce, na płytce Petriego z węglem, lub stosujemy metodę Baermanna.

Hodowle *in vivo* (przy uzyskaniu zgody odpowiedniej komisji etycznej) stosujemy w celu wykrycia *Leishmania* spp. (inokulacja chomika), *T. cruzi* (mysz). *T. gambiense/T. rhodesiense* (szczur, świnka morska), T. *gondii* (mysz), *Trichinella* spp. (mysz).

Pobieranie i przesyłanie materiału, jak wyżej.

E. KONTROLA JAKOŚCI BADAŃ MIKROSKOPOWYCH

Badania parazytologiczne powinny być wykonywane przy użyciu mikroskopu z okularem z podziałką; obiektyw i każdy okular powinien być kalibrowany każdorazowo przy czyszczeniu i zmianie okularu lub obiektywów. Na mikroskopie powinna być naklejona metryczka kalibracji.

Preparat kontrolny powinien być każdorazowo włączony do panelu próbek badanych. Ma to szczególne znaczenie w przypadku rozpoczęcia barwienia preparatów nowym roztworem roboczym barwnika lub nowym barwnikiem.

1. Próbki kontrolne do badań w kierunku malarii:
   - wykonuje się z próbki krwi pobranej na EDTA zawierającej, co najmniej tyle pasożytów, aby jeden znajdował się w każdym z 2-3 pól widzenia. Wykonać cienkie rozmazy, w okresie nie dłuższym niż jedna godzina od pobrania krwi od pacjenta,
   - wysuszone rozmazy należy utrwalić w 100% metanolu (lub przetrzymywać nieutrwalone w stanie zamrożenia),
   - preparaty przechowywać w oznaczonym pudełku w temp. -20°C (lub -70°C); po wyjęciu z zamrażarki, przed użyciem pozostawić do odparowania kondensatu (w przypadku preparatów nieutrwalonych po wyjęciu natychmiast włożyć do naczynia z metanolem).
2. W przypadku innych gatunków pasożytów występujących we krwi niż pierwotniaki z rodzaju *Plasmodium*, preparatem kontrolnym może być rozmaz trwale barwiony ze znanym gatunkiem, postacią rozwojową oraz określoną parazytemię.
3. Próbki kontrolne do badań na obecność pierwotniaków jelitowych:
   Rozmazy z kału zawierającego znane pierwotniaki, takie jak np. *Giardia*, *Cryptosporidium* sp. (z kału bydła) utrwalić i zabarwić odpowiednim barwnikiem; preparaty przechowywać w pudełku w temperaturze pokojowej. Kał przeznaczony do przygotowania próbek kontrolnych powinien być utrwalony w PVA i z niego w razie potrzeby wykonywać rozmazy barwione (różne barwienie w zależności od gatunku pierwotniaka).
4. Próbki kontrolne do badań na obecność helmintów (robaków) układu pokarmowego i moczowo-płciowego powinny zawierać jaja i/lub larwy. Kał lub inny materiał ze znanymi gatunkami pasożytów, uzyskany po zagęszczeniu (sedymentacji), należy utrwalić w 10% formalinie w PBS, po czym można przechowywać przez kilka lat. Jako kontrolę bierzemy jedną kroplę zawiesiny i przykrywamy szkiełkiem nakrywkowym 22x22 mm.

F. KRYTERIA DIAGNOSTYCZNE ROZPOZNAWANIA WYBRANYCH CHORÓB PASOŻYTNICZYCH

1. Definicje przypadków chorób pasożytniczych (kryteria rozpoznawania)

1.1. Definicja diagnostyczna przypadku bąblowicy (*Echinococcus* spp.) została opracowana przez Brunetti i wsp. Acta Tropica, 2010, 114:1-16

1.1.2. Bąblowica jednojamowa: *E. granulosus*

Kryteria kliniczne

Bąblowicę u pacjenta stwierdza się po wystąpieniu, co najmniej jednego z poniższych trzech kryteriów:

1. Wolno rosnąca lub stabilna masa torbieli,
2. Reakcja anafilaktyczna wskutek pęknięcia lub uszkodzenia torbieli,
3. Przypadkowe wykrycie torbieli metodami obrazowymi u bezobjawowych osób lub
4. Wykryte podczas badań przesiewowych.

Kryteria diagnostyczne

1. Typowe zmiany narządowe wykryte technikami obrazowymi (USG, TK, MRI)
2. Swoiste przeciwciała wykryte przez wysoko czułe testy serologiczne, potwierdzone przez odrębny wysoko specyficzny test
3. Badania histopatologiczne lub parazytologiczne typowe dla bąblowicy jednojamowej (np. bezpośrednia obserwacja protoskoleksów lub haków w płynie z torbieli)
4. Wykrycie charakterystycznych morfologicznych cech makroskopowych torbieli w materiale chirurgicznym
5. Wykrycie pasożyta metodami biologii molekularnej

Definicja przypadku bąblowicy jednojamowej (*E. granulosus*)

- **Przypadek możliwy** (podejrzany).
  Każdy pacjent z wywiadem klinicznym lub epidemiologicznym oraz techniki obrazowe lub serologia dodatnie dla *E. granulosus*
- **Przypadek prawdopodobny.**
  Każdy pacjent z dodatnim wywiadem klinicznym, epidemiologicznym, dodatnie techniki obrazowe lub serologia dla *E. granulosus* w dwóch testach (np. za pomocą testów komercyjnych - ELISA-IgG i Western blot (immunoblotting)
- **Przypadek potwierdzony**. Powyższe i dodatkowo do wyboru:

1. demonstracja protoskoleksów lub ich składników, przy użyciu bezpośredniej mikroskopii lub technik biologii molekularnej, w treści torbieli aspirowanej przez przezskórną biopsję (ostatnio nie zaleca się) lub podczas zabiegu chirurgicznego,
2. wygląd zmian w USG, np. odstawanie endocysty w torbieli CE1, i przejście do stadium CE3a, lub odwarstwienie się CE2 lub CE3b, następnie zmiana do CE4, po podaniu Albendazolu (przynajmniej przez trzy miesiące) lub spontanicznie.

1.1.3. Bąblowica wielojamowa (alweokokoza): *E. multilocularis*

Kryteria kliniczne

Co najmniej jedno z poniższych: wolno rozwijający się guz (objawy i cechy różne w zależności od lokalizacji guza, wielkości i rodzaju /twardy, częściowo wielopęcherzykowy, z centralną martwicą/), wykryty technikami obrazowymi.

Kryteria diagnostyczne - przynajmniej jeden z poniższych czterech

1. Typowe zmiany w narządach wykryte technikami obrazowymi (USG jamy brzusznej, TK, MRI)
2. Wykrycie specyficznych przeciwciał przeciw *Echinococcus* spp. za pomocą wysoko czułych testów serologicznych i potwierdzonych przez wysoko specyficzny test.
3. Badania histopatologiczne charakterystyczne dla bąblowicy wielojamowej (alweokokozy)
4. Wykrycie sekwencji nukleotydowych *E. multilocularis* w próbce materiału biologicznego.

Definicja przypadku alweokokozy (*E. multilocularis*)

- **Przypadek możliwy** (podejrzany).
  Każdy pacjent z wywiadem klinicznym lub epidemiologicznym oraz techniki obrazowe lub serologia dodatnie dla *E. multilocularis*
- **Przypadek prawdopodobny.**
  Każdy pacjent z dodatnim wywiadem klinicznym i epidemiologicznym i techniki obrazowe oraz serologia dodatnie dla *E. multilocularis* w dwóch testach
- **Przypadek potwierdzony**. Powyższe i dodatkowo:
  1. histopatologia charakterystyczna dla AE,
  2. i/lub wykrycie sekwencji nukleotydowych *E. multilocularis* w próbce materiału biologicznego.

1.2. Definicja przypadku inwazji pierwotnych *Toxoplasma gondii*

- **Przypadek potwierdzony;**

1. dodatni wynik próby izolacji/hodowli we krwi i płynach ustrojowych (u ciężarnych także w płynie owodniowym),
2. wykrycie DNA we krwi i płynach ustrojowych (u ciężarnych także w płynie owodniowym),
3. serokonwersja – zmiana ujemnego wyniku badania serologicznego na dodatni między dwoma kolejnymi badaniami (w przypadku ciężarnych wtedy, gdy obie próbki surowicy badano po zajściu w ciążę).

- **Przypadek prawdopodobny:**

1. serokonwersja – zmiana ujemnego wyniku badania serologicznego na dodatni między dwoma kolejnymi badaniami (u ciężarnych, gdy jedną z próbek badano przed zajściem w ciążę),
2. znamienny przyrost miana przeciwciał klasy G do wartości wysokich (≥ 300 j.m./ml) między badaniami wykonanymi w odstępie 3 tygodni (Przeciwciała klasy M i A są zazwyczaj obecne w obu próbkach. Leczenie toksoplazmozy może spowodować wzrost miana przeciwciał klasy G).
3. wysokie miana swoistych IgG, obecność IgM/IgA i objawów klinicznych zarażenia (Indeks awidności IgG ≥ 0,300 wskazuje na inwazję pierwotną starszą niż 4 miesiące),
4. stwierdzenie zmian w węzłach chłonnych o typie opisanym przez Piringer-Kuchinka lub trofozoitów (tachyzoitów) pasożyta w tkance w otoczeniu nacieków z limfocytów i makrofagów (wykrycie cyst nie upoważnia do rozpoznania przypadku toksoplazmozy),
5. wysokie miana swoistych IgG u pacjentów bez objawów klinicznych zarażenia i IgM u ciężarnych dotyczy badań wykonywanych w 2.-połowie ciąży).

1.3. Definicja przypadku malarii (*Plasmodium* spp.)

Przypadek potwierdzony:

1. wykrycie postaci rozwojowych pasożyta: trofozoitów, schizontów oraz gametocytów, które mogą być wykrywane jeszcze po wyleczeniu pacjenta,
2. wykrycie kwasów nukleinowych *Plasmodium* spp.

Przypadek prawdopodobny:

1. wykrycie antygenów *Plasmodum* spp. szybkimi testami immunochromatograficznymi niepotwierdzone badaniem mikroskopowym lub molekularnym,
2. wykrycie swoistych przeciwciał IgM.

Przypadek możliwy:

wykrycie swoistych przeciwciał przy pierwszym zachorowaniu (jedyna możliwość wstecznego udokumentowania przebycia choroby)

1.4. Definicja przypadku leiszmaniozy (*Leishmania* spp.)

- **Przypadek potwierdzony:**

1. wykrycie postaci amastigota w pobranym materiale (szpik, śledziona, owrzodzenia skórne, skórno-śluzówkowe),
2. uzyskanie postaci promastigota z hodowli *in vitro* założonej z pobranego materiału,
3. wykrycie DNA *Leishmania* spp.,
4. znamienny poziom swoistych przeciwciał (zwłaszcza w reakcji z antygenem rK39) przy jednoczesnych objawach klinicznych leiszmaniozy trzewnej (hepatosplenomegalii) czy skórno-śluzówkowej w przypadku pierwszego zachorowania.

- **Przypadek prawdopodobny:**

wykrycie swoistych przeciwciał o znamiennym mianie.

1.5. Definicja przypadku pełzakowicy (*Entamoeba histolytica*)

- **Przypadek potwierdzony**:

1. wykrycie w kale trofozoitów i/lub cyst *E. histolytica sensu lato* oraz jednocześnie koproantygenów *E. histolytica sensu stricto*,
2. wykrycie trofozoitów *E. histolytica sensu lato* w tkankach lub w materiale z owrzodzeń ściany jelita,
3. wykrycie DNA *E. histolytica sensu stricto*,
4. serokonwersja w okresie 1-4 tygodni,
5. objawy kliniczne plus znamienne miano u osoby dotychczas nie chorującej na amebozę,

- **Przypadek prawdopodobny**:

1. wykrycie w kale trofozoitów *E. histolytica sensu lato* z erytrocytami w cytoplazmie,
2. wykrycie samych koproantygenów *E. histolytica sensu stricto*,

3. wykrycie swoistych przeciwciał anty- *E. histolytica* u osób chorujących pierwszy raz.

- **Przypadek możliwy**:

1. wykrycie trofozoitów (bez erytrocytów) i/lub cyst *E. histolytica* sensu lato,
2. wykrycie swoistych przeciwciał anty *E. histolytica,*
3. wykrycie koproantygenów *E. histolytica sensu lato.*

1.6. Definicja przypadku kryptosporydiozy (*Cryptosporidium spp.*)

- **Przypadek potwierdzony:**

1. wykrycie oocyt *Cryptosporidium* spp. metodą: Ziehl-Nielsen'a, immunofluorescencji bezpośredniej (np. MeriFluor) lub FISH,
2. wykrycie DNA *Cryptosporidium* spp.

Uwaga: gatunek lub genotyp *Cryptosporidium* można określić tylko na podstawie analizy DNA.

- **Przypadek prawdopodobny**:

wykrycie koproantygenów *Cryptosporidium parvum* oraz objawy kliniczne u osób immunoniekompetentnych lub dzieci poniżej 2 roku życia.

- **Przypadek możliwy**:

wykrycie koproantygenów *Cryptosporidium parvum* bez objawów klinicznych, pacjent bez zaburzeń odporności.

1.7. Definicja przypadku giardiozy (*Giardia intestinalis/G. lamblia*)

- **Przypadek potwierdzony:**

1. wykrycie trofozoitów i/lub cyst *G. intestinalis* w badaniu mikroskopowym treści dwunastnicy lub kału,
2. wykrycie cyst *G. intestinalis* w kale metodą immunofluorescencji bezpośredniej (np. Meri-Fluor) lub FISH,
3. wykrycie DNA *G. intestinalis.*

- **Przypadek prawdopodobny**:

wykrycie koproantygenów *G. intestinalis* (GSA-65 kDa) oraz występowanie objawów **k**linicznych.

- **Przypadek możliwy**:

1. wykrycie tylko koproantygenu *G. intestinalis* bez objawów klinicznych,
2. dodatni wynik badania serologicznego.

1.8. Definicja przypadku wągrzycy (cysticercus *T. solium*)

- **Przypadek potwierdzony**:

wykrycie swoistych przeciwciał IgG anty – *T. solium* (wynik potwierdzony testem Western blot) i dodatni wynik TK/NMR i występowanie objawów klinicznych ze strony OUN, ewentualnie dodatni wynik RTG mięśni,

- **Przypadek prawdopodobny**:

wykrycie przeciwciał anty – *T. solium* IgG,

- **Przypadek możliwy**:

wykrycie w kale jaj *Taenia* spp. i/lub członów *T. solium*.

1.9. Definicja przypadku włośnicy (*Trichinella* spp.)

- **Przypadek potwierdzony:**

wykrycie larw w biopsji mięśnia naramiennego (gatunek określony na podstawie analizy DNA),

- **Przypadek prawdopodobny**:

wykrycie swoistych przeciwciał oraz wspólne źródło zarażenia oraz występowanie objawów klinicznych,

- **Przypadek możliwy**:

objawy chorobowe podobne do występujących u osoby zarażonej.

1.10. Definicja przypadku toksokarozy (*Toxocara* spp.)

- **Przypadek prawdopodobny:**

występowanie objawów klinicznych toksokarozy, potwierdzony kontakt z psami/kotami, wykrycie swoistych przeciwciał, wysoka eozynofilia (postać trzewna).

- **Przypadek możliwy**:

wykrycie swoistych przeciwciał.

Uwaga: badania koproskopowe nie mogą być stosowane do wykrycia pasożyta.

1.11. Definicja (określenie) przypadku anisakidozy (*Anisakis simplex*, *Pseudoterranowa decipiens, Contracaecum* spp.)

- **Przypadek potwierdzony:**

wykrycie larw *Anisakis* (*Pseudoterranova*) w materiale pobranym podczas gastroskopii (duodenoskopii) lub zabiegu chirurgicznego.

- **Przypadek prawdopodobny**:

wystąpienie nagłych objawów klinicznych sugerujących ostry wrzód plus spożywanie surowych ryb morskich (lub ich przetworów) przed zachorowaniem.

1.12. Definicja przypadku pozostałych parazytoz (pasożytów)

- **Przypadek potwierdzony**:

1. wykrycie i poprawne rozpoznanie postaci rozwojowych pasożyta,
2. wykrycie jego kwasów nukleinowych z adekwatnego materiału biologicznego,
3. uzyskanie pasożyta w hodowli *in vitro.*

- **Przypadek prawdopodobny**:

1. wywiad epidemiologiczny plus objawy kliniczne i/lub wykrycie antygenu szybkimi testami immunochromatograficznymi bez potwierdzenia badaniem mikroskopowym lub molekularnym,
2. wykrycie swoistych przeciwciał o znamiennym mianie (przy pierwszym zarażeniu) i/lub dodatnim teście potwierdzającym.

- **Przypadek możliwy**:

wykrycie swoistych przeciwciał o niskim mianie (przy pierwszym zarażeniu) lub średnie albo wysokie miano u osób z terenów endemicznych (wysokie tło).

1.13. Definicje przypadków chorób wywoływanych przez stałe ektopasożyty.

1.13.1. Definicja przypadku wszawicy głowowej (*pediculosis capitis*)

- **Przypadek potwierdzony** (wszawica aktywna):

złoty standard - znalezienie żywych nimf lub postaci dorosłych na włosach lub skórze głowy (liczba zazwyczaj ok. 10/osobę).

- **Przypadek prawdopodobny**:

wykrycie jaj żywych (w odległości do ok. 6 mm – 1 cm od podstawy włosa) lub pustych (w odległości > 1 cm od pod-

stawy włosa), przytwierdzonych do włosów.

- **Przypadek możliwy:**

1. diagnostyka objawowa: świąd owłosionej skóry głowy i karku;
2. zmiany wypryskowe; przeczosy i otarcia naskórka;
3. wysięk surowiczego płynu,
4. sklejone włosy (ewentualnie wystąpienie kołtuna - *plica polonica*); powiększenie węzłów chłonnych karkowych.

1.13.2. Definicja przypadku wszawicy odzieżowej (*pediculosis corporis*)

- **Przypadek potwierdzony:**

znalezienie żywych nimf i dorosłych wszy na odzieży (liczba wszy na osobnika –zazwyczaj ok. 10), najczęściej w talii i pod pachami.

- **Przypadek prawdopodobny**:

1. występowanie plam błękitnych (*maculae ceruleae*) (cecha patognomoniczna wszawicy);
2. stwierdzenie zgrubiałej, szorstkiej skóry, z przebarwieniami („choroba włóczęgów”);
3. znalezienie jaj w fałdach i szwach odzieży (najczęściej w miejscach styku ubrania ze skórą) oraz odchodów wszy na powierzchni odzieży.

- **Przypadek możliwy** (diagnostyka objawowa):

1. występowanie świądu najczęściej w okolicach pach, pachwin, miedzy łopatkami (miejscach zakrytych odzieżą);
2. przeczosy, nadżerki i strupy zakrywanych powierzchni skóry.

1.13.3. Definicja przypadku wszawicy łonowej (*phtiriasis*)

- **Przypadek potwierdzony:**

znalezienie żywych nimf i postaci dorosłych wszy na włosach zainfestowanych rejonów, blisko powierzchni skóry.

- **Przypadek prawdopodobny**:

1. występowanie plam błękitnych (*maculae ceruleae*) (cecha patognomoniczna wszawicy);
2. znalezienie jaj przytwierdzonych do trzonów włosów wzgórka łonowego i pod pachami; u mężczyzn do włosów porastających klatkę piersiową i brodę; do brwi i rzęs (u dzieci lub przy silnej intestacji); punkcikowate, czarne plamki krwi i kału na bieliźnie.

- **Przypadek możliwy** (diagnostyka objawowa):

występowanie świądu skóry okolicy łonowej, krocza, pachwin, ud, brzucha i dołów pachowych, zapalenie spojówek i brzegów powiek, przeczosy, powiększenie węzłów chłonnych pachwinowych i pachowych.

1.13.4. Definicja przypadku świerzbu (*scabies*)

- **Przypadek potwierdzony:**

znalezienie świerzbowców, jaj lub kuleczek odchodów w preparacie bezpośrednim z powierzchni zmian skórnych (zeskrobiny, usunięcie igłą samicy widocznej na końcu korytarza, jako biały lub szary punkcik); pomocne w rozpoznaniu świerzbu może być również badanie dermatoskopowe.

- **Przypadek prawdopodobny**:

stwierdzenie charakterystycznych, zygzakowatych, lub w kształcie litery „S” kanalików świerzbowcowych (dodatnia próba atramentowa), interpretacja może być trudna, jeżeli kanaliki są nieliczne i/lub „zamaskowane” zadrapaniami

- **Przypadek możliwy** (diagnostyka objawowa):

charakterystyczny, długotrwały świąd, nasilający się w nocy (najczęściej występuje w okolicach pępka, na nadgarstkach, łokciach, pośladkach, w okolicach narządów płciowych, w okolicach nosa; u dzieci często na dłoniach i podeszwach stóp), linijne przeczosy w miejscach typowych, wysypka grudkowo – pęcherzykowa, wywiad ukierunkowany na występowanie podobnych objawów wśród osób z otoczenia chorego.

1.13.5. Definicja przypadku nużycy (*demodecosis*)

- **Przypadek potwierdzony:**

wykrycie larw, nimf i postaci dorosłych w preparacie bezpośrednim z powierzchni zmian skórnych, w wydzielinie z gruczołów łojowych, na rzęsach lub brwiach oraz mieszkach włosowych).

- **Przypadek prawdopodobny**:

stwierdzenie wypadania rzęs, brwi, włosów z przedsionka nosa, uporczywe zapalenie spojówek i powiek (opuchnięcie, łzawienie, wysięk ropny), zrogowaciałe, wystające ponad powierzchnię skóry mieszki włosowe, zwiększona produkcja łoju i duże zaskórniki, w przypadku zajęcia przewodów usznych: wysięki, zwiększona produkcja łoju, nadmierne złuszczanie naskórka, nieprzyjemny zapach; stany zapalne skóry narządów płciowych i ich okolicy.

- **Przypadek możliwy** (diagnostyka objawowa):

najczęściej występuje infestacja bezobjawowa, okresowe, lekkie swędzenie brwi i powiek, głównie u podstawy rzęs, zmiany skórne na skrzydełkach nosa, policzkach i czole, pigmentacja.

Adres do korespondencji:
Zakład Parazytologii Tropikalnej
Międzywydziałowy Instytut Medycyny Morskiej i Tropikalnej
Gdański Uniwersytet Medyczny
81-519 Gdynia, ul. Powstania Styczniowego 9b,
e-mail: pemyjak@gumed.edu.pl